

# **Isolation, phylogenetische Analyse und Funktion von Wnt-Liganden aus *Nematostella vectensis***

**vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades**

**eines Doctor rerum naturalium**

**genehmigte**

**Dissertationsschrift von**

**Arne Kusserow**

**aus Konstanz**

Berichterstatter (1. Referent): Prof. Dr. Thomas Holstein

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 20.05.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.05

Darmstadt 2005

D 17

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Evolution mehrzelliger Tiere	2
2.1.1 Entstehung von Mehrzelligkeit und Aufgabenteilung	2
2.1.2 Entstehung von Polarität und Körperachsen	3
2.1.3 Ur-Eumetazoa	3
2.1.4 Monophylie des Tierreichs	5
2.2 Die Nesseltiere (Cnidaria)	5
2.2.1 Phylogenetische Position der Cnidaria	5
2.2.2 Phylogenetische Position von <i>N. vectensis</i> innerhalb der Cnidaria	6
2.2.3 Embryonalentwicklung der Cnidarier	7
2.2.4 Körperbauplan der Cnidarier	8
2.3 Der Modellorganismus <i>N. vectensis</i>	10
2.3.1 Die geographische Verbreitung von <i>N. vectensis</i>	10
2.3.2 Das natürliche Habitat	11
2.3.3 Körperbauplan von <i>N. vectensis</i>	12
2.3.3.1 Körpersäule	12
2.3.3.2 Embryonalentwicklung von <i>N. vectensis</i>	13
2.4 Die Familie der Wnt Signalmoleküle	15
2.4.1 Nomenklatur der Wnt-Liganden	15
2.4.2 Proteinstruktur der Wnt-Liganden	15
2.4.3 Von Wnt-Liganden ausgelösten Signalkaskaden	16
2.4.4 Interaktionen der Wnt Signalwege untereinander und mit anderen Signalwegen	19
2.4.5 Die Rolle von Wnt Liganden bei Erkrankungen des Menschen	20
2.5 Wnt-Liganden in Cnidaria	21
2.6 Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit	21

3 Ergebnisse	23
3.1 Bekannte Transkriptbereiche für Wnt-Liganden aus <i>N. vectensis</i>	23
3.2 Vervollständigung von Wnt-Transkriptsequenzen aus <i>N. vectensis</i>	25
3.3 Alignierung von putativen Wnt Aminosäuresequenzen	40
3.4 Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse von Wnt Aminosäuresequenzen verschiedener Metazoen	41
3.5 Identifizierung Wnt-subfamilienspezifischer Aminosäuresequenzmerkmale	46
3.6 Analyse der räumlichen Verteilung der <i>NvWnt</i> -Genexpression	47
3.6.1 Expression von <i>NvWnt1</i>	47
3.6.2 Expression von <i>NvWnt4</i>	48
3.6.3 Expression von <i>NvWnt7a</i>	49
3.6.4 Expression von <i>NvWnt10</i>	50
3.6.5 Expression von <i>NvWnt11</i>	50
3.6.6 Expression von <i>NvWntA</i>	52
3.7 Überexpression durch Injektion von <i>NvWnt11</i> mRNA in <i>N. vectensis</i> Embryonen	54
3.8 Fremdexpression durch Injektion von <i>NvWnt11</i> mRNA in <i>Xenopus</i> <i>laevis</i> Embryonen	57
3.9 Rettung des vom <i>XWnt11</i> -Morpholino erzeugten Funktionsverlustes durch die Koinjektion von <i>NvWnt11</i>	59
3.10 Fremdexpression durch Injektion von <i>NvWntA</i> mRNA in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen	60
4 Diskussion	64
4.1 Vervollständigung von Wnt Transkriptsequenzen aus <i>N. vectensis</i>	64
4.2 Alignierung von putativen Wnt Aminosäuresequenzen	65
4.3 Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse von Wnt Aminosäuresequenzen verschiedener Metazoen	66
4.4 Vorschläge zur Nomenklatur der Wnt-Liganden	72
4.5 Evolutionäre Herkunft von Wnt-Liganden	73

4.6 Analyse der Funktion von Wnt-Liganden in <i>N. vectensis</i>	74
4.6.1 Wnt-Liganden mit axialen Expressionsmustern	74
4.6.2 Radiärsymmetrie und direkte Achse	78
4.6.3 Wnt-Gene und sekundäre Körperachsen	78
4.6.4 Wnt-Liganden mit einer Expression in bestimmten Zellpopulationen	81
4.6.5 Wnt-Liganden mit unbekannter Expression	82
4.7 Konservierung der Funktion von Wnt-Liganden Subfamilien in der Evolution	82
4.8 Phylogenetische Position der Cnidaria	84
4.9 Evolution mehrzelliger Tiere	85
5 Material und Methoden	91
5.1 Versuchstiere	91
5.1.1 Herkunft der verwendeten Tiere	91
5.1.2 Kultur von <i>N. vectensis</i>	91
5.1.3 Induktion der Gametogenese	91
5.1.4 Entnahme von Embryonen	92
5.2 Isolation von RNA	93
5.2.1 Lysis der Tiere	93
5.2.2 RNA Isolation	93
5.3 Herstellung cDNA	93
5.3.1 Herstellung von cDNA zum Kompletieren eines cDNA-Fragmentes in 3'-Richtung	94
5.3.2 Herstellung von cDNA zum Kompletieren eines cDNA-Fragmentes in 5'-Richtung	94
5.4 Durchführung von PCR-Reaktionen zur Kompletierung von Genfragmenten	96
5.4.1 5'-RACE	96
5.4.2 3'-RACE	97
5.4.3 PCR zur Erzeugung vollständiger kodierender Transkriptbereiche	98

5.5 Ligation, Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung	99
5.6 Alignierung von Aminosäuresequenzen	100
5.7 Berechnung molekularer Stammbäume	102
5.8 Analyse der räumlichen Transkriptexpression: In situ Hybridisierung	103
5.8.1 Herstellung von RNA-Sonden	103
5.8.2 Durchführung der in situ Hybridisierung	104
5.8.2.1 Relaxieren und Fixieren von Tieren für die in situ Hybridisierung	104
5.8.2.2 Vorbehandlung und Hybridisierung	104
5.8.2.3 Posthybridisierungswaschungen, Blockierung und Antikörperinkubation	105
5.8.2.4 Detektion der gebundenen Sonde	106
5.9 Über- und Fremdexprimierung von mRNA durch Injektion	106
5.9.1 Herstellung der Matrize für die Synthese von mRNA	106
5.9.2 mRNA-Synthese	107
5.9.3 Überexpression durch Injektion von endogener mRNA in <i>N. vectensis</i> Embryonen	108
5.9.4 Fremdexpression von <i>N. vectensis</i> Wnt mRNA in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen durch Injektion	108
5.9.5 Die Reduktion endogener mRNA durch Injektion von Morpholinos in <i>Xenopus laevis</i>	110
5.9.6 Die Rettung der Entwicklungsfähigkeit morpholinobehandelter <i>Xenopus laevis</i> Embryonen durch die Injektion von homologer mRNA aus <i>N. vectensis</i>	110
5.10 Mikroskopie und Photographie der Präparate	110
6 Literaturverzeichnis	111
7 Anhänge	120
Lebenslauf	
Eidesstattliche Erklärung	

Die Wnt-Genfamilie kodiert für sekretierte Signalmoleküle, die über verschiedene Signalkaskaden fundamentale Entwicklungsprozesse, wie axiale Musterbildung, Zellschicksalsentscheidungen und die Entstehung von Erkrankungen, in allen daraufhin untersuchten Tieren auslösen. Im Menschen sind 12 Subfamilien der Wnt-Liganden identifiziert worden. Sechs dieser Subfamilien sind auch in Ecdysozoen ( zum Beispiel: *Anopheles gambiae* und *Caenorhabditis elegans*) vertreten. Die Cnidaria (Nesseltiere) sind eine evolutionär sehr ursprüngliche Tiergruppe, deren Körper nur eine Körperachse, die oral-aboral Achse und zwei Keimblätter, Ectoderm und Endoderm besitzt. Die Anthozoa (Seeanemonen) gelten als die basale Gruppe der Cnidaria. In der Seeanemone *Nematostella vectensis* wurden zwölf verschiedene Wnt-Sequenzen identifiziert. Für die vorliegende Arbeit wurden Fragmente der Wnt-Transkripte von *N. vectensis* komplettiert und nach der Errechnung von molekularen Stammbäumen mit der Ausstattung mit Wnt-Liganden anderer Tiere verglichen. Die einzelnen *N. vectensis* Wnt-Sequenzen lassen sich mit guter statistischer Unterstützung in elf der zwölf im Menschen vorkommenden Wnt-Subfamilien einordnen. Fünf der Subgruppen gingen in der Evolution der Ecdysozoa verloren. Nach der allgemein gültigen Auffassung besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Komplexität des Genoms und der Morphologie von Organismen. Das wirft die Frage auf, zu welchem Zweck so einfache Organismen wie *N. vectensis* eine derart komplexe Ausstattung an Morphogenen besitzen. Die durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, daß acht der Transkripte, in einer gestaffelten Anordnung entlang der Körpersäule der Planularlarve, exprimiert sind. Fünf im Ektoderm und drei im Endoderm. Eine solche Anordnung der Wnt-Expressionsdomänen ist auch im Gehirn von Wirbeltierembryonen zu finden. Das Expressionsmuster sowie Über- und Fremdexpressionsexperimente in *N. vectensis* und *Xenopus laevis*, weisen darauf hin, daß Wnt-Liganden eine zentrale Funktion in der Gastrulation und der Etablierung von Symmetrieachsen im Verlauf der Entwicklung von *N. vectensis* haben. Die komplexe Ausstattung an Wnt-Subfamilien muß in frühen vielzelligen Organismen vor über 650 Millionen Jahren entstanden sein, was darauf hinweist, daß diese Gengruppe eine Rolle bei der Evolution der verschiedenen Körperbauplänen rezenter Organismen spielte.

## 2. Einleitung

### 2.1 Evolution von mehrzelligen Tieren

Nach der derzeit vorherrschenden Ansicht sind die verschiedenen heute existierenden Körperbaupläne der Tiere vor ungefähr 540 Millionen Jahren vor und während der kambrischen Explosion entstanden. Zu dieser Zeit wurden erstmals die Reste von Tieren mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Körperbauplänen in Sedimenten abgelagert. Alle wirbellosen Tierstämme sind ab dieser Phase als Fossilien vertreten. Bislang konnten nur wenige Fossilien entdeckt werden, die deutlich früher entstanden. Darunter auch Planulalarven von Cnidaria, die in der Doushantouformation in China gefunden wurden (Chen et al., 2002; Chen et al., 2000). Diese Formation wurde vor 550-570 Millionen Jahren abgelagert. In den Ablagerungen wurden Fossilien identifiziert, die eindeutige Merkmale eines bilateralsymmetrischen Körperbaus aufweisen (Chen et al., 2000). Die Evolution der Bilateralsymmetrie und der dazu notwendigen genetischen Ausstattung hat demzufolge präkambrisch stattgefunden.

#### 2.1.1 Entstehung von Mehrzelligkeit und Aufgabenteilung

Am Beginn der Evolution zur Mehrzelligkeit haben einzellige Eukaryonten begonnen, sich nach der Zellteilung nicht mehr zu trennen, sondern sich zu Zellverbänden zusammenzuschließen. Zunächst haben sie vermutlich Zellketten und Zellklumpen gebildet. Dieser Zustand ist heute noch bei einigen Choanoflagellaten zu finden (Storch und Welsch, 1991). Diese Gruppe der Protozoen wird oft als die Basis der Evolution zur Vielzelligkeit betrachtet. Choanoflagellaten besitzen einen Kranz aus Mikrovilli um die Basis ihrer Flagellen. Dieser Kranz ähnelt dem der Kragengeißelzellen der Schwämme, die als ursprünglichste Metazoengruppe angesehen wird. In Planulalarven und dem Tentakelektoderm rezenter Anthozoa kommen ebenfalls ähnliche Zellen vor (Lyons, 1973). Auch im Gastralraum der Echinodermen finden sich Zellen mit ähnlichen Eigenschaften (Martinez et al., 2005).

Durch die Protozoengruppe der Flagellaten (Geißeltierchen) verläuft die Grenze zwischen Tier- und Pflanzenreich (Storch und Welsch 1991). In dieser Gruppe

kommen sowohl Autotrophie durch Photosynthese (Phytoflagellaten) als auch Heterotrophie (Zooflagellaten) vor. Die Einheitlichkeit der Protozoen als Gruppe ist jedoch umstritten. So wurden Myxozoa (Myxosporidia) lange als Mitglieder dieser Gruppe angesehen. Diese Organismen bilden mehrzellige Sporen, die aus 1-6 sogenannten Polkapseln bestehen. Diese Polkapseln entsprechen in ihrem Bau den Nesselzellen der Cnidaria und dienen ausschließlich zur Verankerung am Wirtsgewebe dieser Parasiten, nicht wie bei Microsporidien zum Einschleusen von Zytoplasma in den Wirt (Storch und Welsch, 1991). Heute sieht man die Myxozoa als sehr enge Verwandte der Cnidaria (Kent et al., 2001).

### 2.1.2 Entstehung von Polarität und Körperachsen

Einfache Formen der Polarität eines Tieres könnten allein durch verschiedene Varianten von Zelladhäsionsmolekülen zustande gekommen sein. Ist die Affinität von Zelladhäsionsmolekülen des gleichen Typs zueinander höher als zu einem anderen Typ, entstehen Areale mit Zellen des einen Typs auf der Oberfläche der Zellhohlkugel. Bei der Etablierung von Abstufungen von Affinitäten zueinander entstünde eine einfache Hauptkörperachse mit einer gestaffelten Anordnung der Zellen. Flexibler und mit größerer Reichweite ist jedoch die Sekretion von Signalmolekülen. Im einfachsten Falle gibt eine einzelne Zelle eine Substanz ab. Andere Zellen können diese Substanz abfangen. Durch die Aufnahme der Substanz durch eine Zielzelle sinkt die Konzentration der Substanz in Abhängigkeit von der Entfernung von der Zelle, welche die Substanz abgibt. So kann die Zielzelle die Konzentration der Substanz detektieren und auf diese Weise genau den Abstand zur sezernierenden Zelle bestimmen (Gierer und Meinhardt, 1972). Dieses System kann genaue Positionsinformationen für jede einzelne Zelle innerhalb der Diffusionsreichweite der Substanz erzeugen. Zudem kann ein solches System einfach erweitert werden und mehrere Achsensysteme innerhalb eines Organismus erzeugen.

### 2.1.3 Ur-Eumetazoa

Durch Veränderung der Zellform bewegen sich einzelne Zellen (Ingression) oder ganze Zellverbände (Invagination), von der Oberfläche der Zellkugel ins Innere



der Kugel und bilden eine zweischichtige Hohlkugel mit einem äusseren Epithel, dem Ektoderm, und einem inneren Epithel, dem Endoderm. Diese Form (Gastrula) durchleben alle Tiere noch heute in ihrer frühen Individualentwicklung. Die Verbindung zwischen den Epithellagen bildet den Urmund (Blastoporus). Der Blastoporus ermöglicht es, die Resorption von Nährstoffen in den Innenraum (Gastralraum) des Tieres zu verlagern, wo dieses die Eigenschaften des Raumes kontrollieren kann. Sowohl zur Ernährung, als auch zur Findung von Partnern für die Vermehrung und zur Erschließung neuer Habitate ist es wichtig, sich gerichtet und aktiv im Medium bewegen zu können. Dies führt zu einem entlang der Bewegungsrichtung verlängerten Körperbau. Der hypothetische Ur-Eumetazoo, besaß als letzter gemeinsamer Vorfahre aller rezenten Tiere nur eine Hauptkörperachse, die es durch einen einfachen Satz an Morphogenen wie zum Beispiel den Wnt Signalmolekülen etablierte. Es bestand aus zwei Keimblättern, dem Ektoderm und dem Endoderm und ähnelte vermutlich der Planulalarve eines modernen Anthozoo. Die molekulare Ausstattung für die Evolution komplexer Körperbaupläne könnte durch immer wieder erfolgende Verdopplungen des Genoms oder von Genomteilen und einzelnen Genen entstanden sein. Mutationen in einer der Kopien des entsprechenden Gens und der Anpassung an eine neue Funktion könnten so die genetische Ausstattung während der Evolution immer mehr erweitert haben (Ohno, 1970). Mit der Möglichkeit, bei Bedarf eine genetische Einheit zu verdoppeln und mit einer verwandten Funktion zu versehen, können Tiere über die Abgabe von Morphogenen auch Untereinheiten ihres Körpers genauer definieren, indem die Signale unterschiedlich weit reichen und an unterschiedlichen Positionen abgegeben werden. Ein Beispiel für eine solche regional gestaffelte Expression von Genen, die aus einem einzigen Vorläufermolekül entstanden sind, sind die HOX-Gene (Baguna und Ruitort, 2004; Martinelli und Spring 2004), die in allen daraufhin untersuchten Tieren eine Funktion in der Regionalisierung entlang der Hauptkörperachse haben. Eine weitere Gruppe von Genen, die in der Achsenbildung und in der Regionalisierung von Tieren eine Rolle spielen, sind die Wnt-Gene, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden.

#### 2.1.4 Monophylie des Tierreiches

Heute geht man aufgrund molekularer (Peterson and Earnisse, 2001) und morphologischer Daten davon aus, daß alle rezenten Tiere einen einzigen, mehrzelligen gemeinsamen Vorfahren haben; also monophyletisch sind. Der Ursprung dieses Phylums sollen Ansammlungen von Choanoflagellaten sein (Dewel, 2000). Schleimpilze wie *Dyctostelium discoideum* stellt man den echten Metazoen als Schwestergruppe beiseite, da deren Einzelzellen während der Phase der einzelligen Lebensphase dieser „Organismen“ amöboid sind und somit einer anderen Protozoengruppe angehören als die Choanoflagellaten. In diesem einfachen „Organismus“ konnten Komponenten des Wnt-Signalweges identifiziert werden, obwohl sie hier vermutlich in anderem Zusammenhang wirken (Plyte et al., 1999). In Schwämmen fand man ein einzelnes HOX-ähnliches Gen, welches man als ProtoHOX bezeichnet (Degnan et al., 1995). Obwohl einzelne Komponenten (frizzled, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin) des kanonischen Wnt Signalweges identifiziert wurden (Huang und Klein 2004; Meijer et al., 2000; Guidice, 2001; Harwood et al., 1995; Brown und Firtel, 1999; Coates et al., 2002), konnten Wnt Gene bislang weder in den Schwämmen, noch in den Schleimpilzen identifiziert werden (King et al., 2003). Daher ist bislang kein Vorläufermolekül für diese Genfamilie bekannt.

### 2.2 Die Nesseltiere (Cnidaria)

#### 2.2.1 Phylogenetische Position der Cnidaria

An der Basis der Phylogenie des Tierreiches stehen die Schwämme, welchen eine Regionalisierung entlang von Körperachsen fehlt. Die einfachsten Tiere, die eine definierte Körperachse ausbilden, sind die Nesseltiere (Cnidaria). Dieser Stamm besteht aus den Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa und Anthozoa. Die Cnidaria gelten als Schwestergruppe der Bilateria (Collins, 1998). Die Entwicklungslinien dieser Organismengruppen haben sich präkambrisch voneinander getrennt (Hedges et al., 2004; Brook und Holland, 2003).

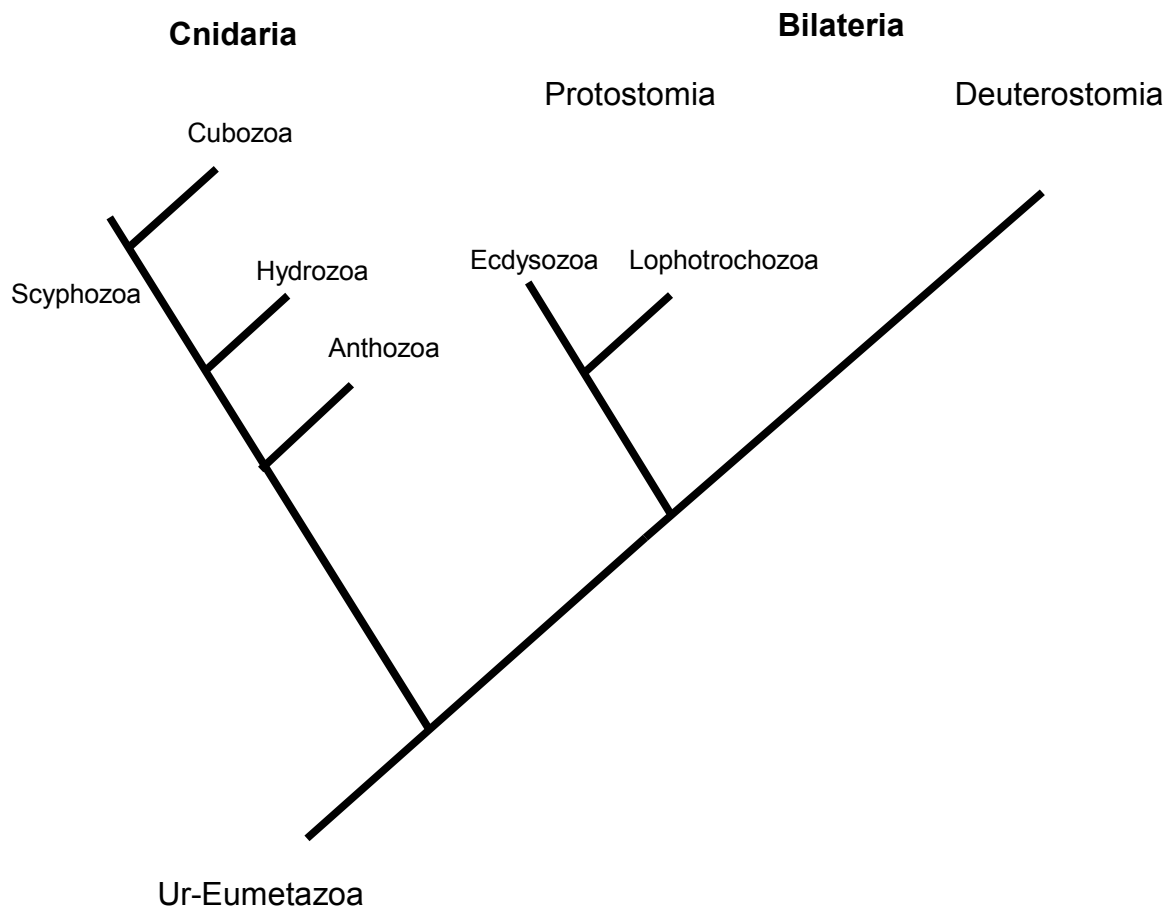


Abb.1: Phylogenetische Position der Cnidaria.

Die Cnidaria (Scyphozoa mit ihrer Seitengruppe Cubozoa, Hydrozoa und Anthozoa) als Schwestergruppe der Bilateria (Protostomia und Deuterostomia).

### 2.2.2 Phylogenetische Position von *N. vectensis* innerhalb der Cnidaria

*N. vectensis* gehört zu den Anthozoa. Anthozoa gelten als die basale Gruppe innerhalb der Cnidaria, sowohl aufgrund des Fehlens einer Medusengeneration, als auch aufgrund der Analyse von 18S rRNA (Bridge et al., 1995; Medina et al., 2001). Die Stellung der Familie Edwardsiidae, der *N. vectensis* angehört, innerhalb der Anthozoa ist umstritten. Edwardsiidae haben Merkmale, die auf eine basale Stellung hinweisen. Die adulten Tiere besitzen die larvale Anzahl an Mesenterien (8) und die basale Fußscheibe anderer Anthozoagruppen fehlt vollständig. Ob diese Merkmale basal oder eine Anpassung an die Lebensweise im Substrat und damit abgeleitet sind, ist nicht vollständig geklärt (Daly et al., 2002).

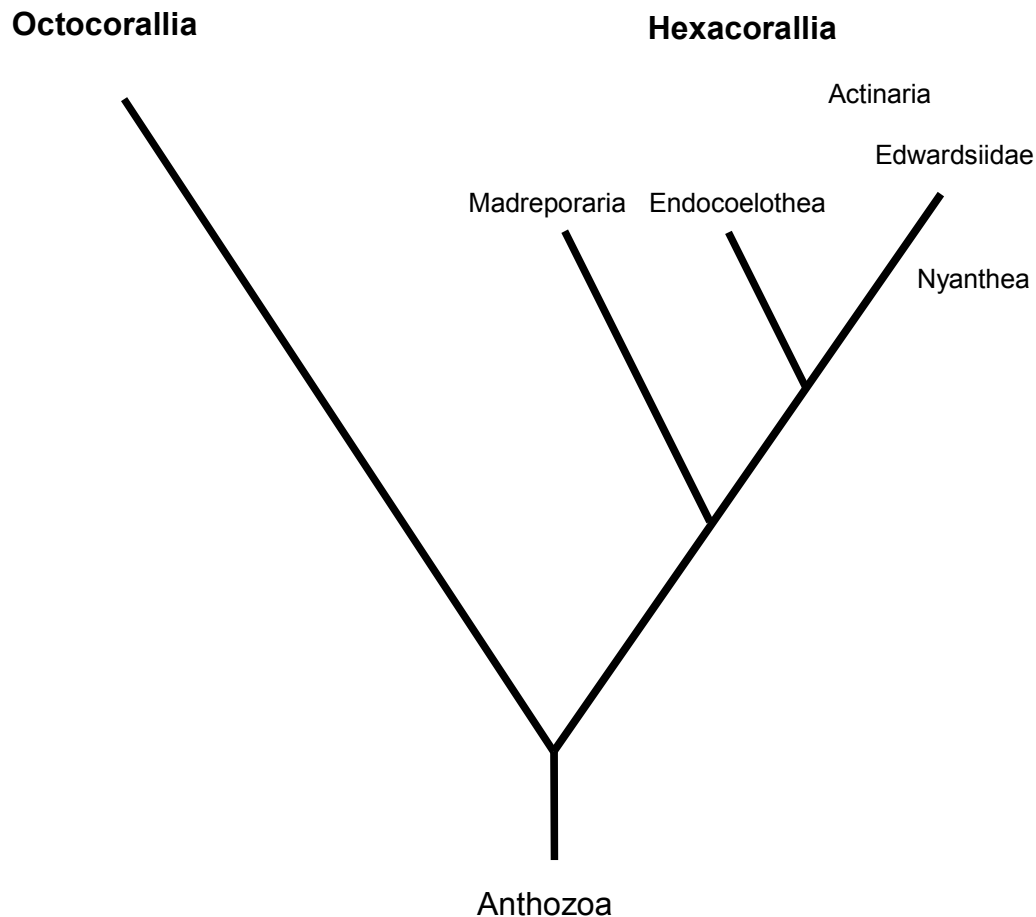


Abb.2: Phylogenie der Cnidaria.

Stark vereinfachter, schematischer Stammbaum der Cnidaria. *N.vectensis* gehört zu den Hexacorallia, Actinaria, Nyanthea, Edwardsiidae. Weitere Untergruppen innerhalb der Nyanthea sowie andere Verzweigungen werden nicht gezeigt.

### 2.2.3 Embryonalentwicklung der Cnidaria

Die Embryonalentwicklung der Cnidaria ist sehr variantenreich. Komplexere Tiere haben hingegen immer einen feststehenden Entwicklungsmodus. Der Ablauf der ersten Zellteilungen ist in jedem Individuum komplexerer Spezies identisch. Dies gilt auch für die folgenden Entwicklungsschritte. So weisen Tiere auch während der Gastrulation innerhalb eines Taxons ähnliche Vorgänge auf. Bei den Cnidaria jedoch ist eine Vielzahl verschiedener Teilungsmodi (Fritzenwanker, 2004) und Gastrulationsmechanismen beobachtet worden (Tardent, 1993; Gilbert und Raunio, 1997).

## 2.2.4 Körperbauplan der Anthozoa

Der Körperbauplan der Cnidaria ist sehr einfach. Die Tiere bestehen aus zwei Epithelien, dem Ektoderm und dem Endoderm. Diese bilden einen Hohlzylinder, der am basalen Ende in einer Fußstruktur endet und am apikalen Ende eine einzige Öffnung zum umgebenden Medium besitzt. Um diesen Mund herum sitzen Tentakel, die Nahrungspartikel aus dem Medium in den Mund befördern. Das Endoderm besteht zum größten Teil aus Zellen, die zur Nährstoffaufnahme und Verteilung dienen (Gastroendodermis). Zwischen den beiden Epithelien liegt eine Schicht aus extrazellulären Strukturmolekülen, die Mesogloea. In dieser Schicht bewegen sich einige wenige Zellen amöboid fort.

Dieser einfache Körperbauplan ist bei den Hydrozoa realisiert, während sowohl bei den Scyphozoa als auch bei den Anthozoa weitere Unterteilungen des Gastralraumes zu finden sind. Bei diesen beiden Gruppen findet man Ausstülpungen des Endoderms in den Gastralraum. Diese aus zwei Lagen Endoderm, mit einer eingelagerten Mesogloea, bestehenden Septen liegen immer in einer geraden Anzahl vor. Bei den Scyphopolypen sind es immer vier, die von Muskelzellen ektodermalen Ursprungs durchzogen sind. Diese Muskelzellen bilden bei den Scyphozoa die einzige Muskulatur. Bei den Anthozoa können sehr viele Septen, bei Anthozoa Mesenterien genannt, vorhanden sein, um die zum Teil sehr großen Tiere (bis 1m) zu stützen. Die Mesenterien kommen stets in gerader Anzahl vor. Die Septenmuskulatur der Anthozoa besteht aus Epithelmuskelzellen endodermalen Ursprungs, welche eine Seite des Mesenteriums verdicken und als Muskelfahnen bezeichnet werden. Auch die Geschlechtsprodukte der Anthozoa liegen in den Mesenterien. Der freie Rand der Mesenterien bildet Mesenterialfilamente. Diese fädigen Anhänge sind dicht mit Sekretions- und Resorptionszellen besetzt. Am äußeren Rand der Filamente sitzen Nesselzellen, die dem Beutefang und der Nahrungsaufnahme dienen. Bei manchen Aktinien tragen die Septenränder sehr lange, nesselkapselbesetzte Wehrfäden (Akontien), die durch den Mund ausgestoßen werden können. Zur Abgabe der Geschlechtsprodukte brechen die Mesenterien einseitig auf und die Gameten werden durch den Gastralraum des Tieres, entweder durch den Mund oder durch spezielle Poren am Fuß des Tieres, in das Medium abgegeben. Cnidaria gelten als primär radiärsymmetrisch, da ihr Körper auf den ersten Blick

drehrund ist (Storch und Welsch, 1991). Jedoch wurden schon früh (Stephenson, 1935) morphologische Asymmetrien entdeckt, welche die Radiärsymmetrie in Frage stellen. So ist bei einigen Anthozoa, zum Beispiel auch bei *N. vectensis*, der Syphonoglyph (Wimperrinne), nur an einer Seite des schlitzförmigen Blastoporus zu finden. Diese zweite Körperachse wurde „direktive Achse“ genannt. Dadurch soll der klassischen Auffassung der Radiärsymmetrie der Cnidaria folgend, die zweite Symmetrieachse der Anthozoa von der bilateralsymmetrischer Tiere unterschieden werden.

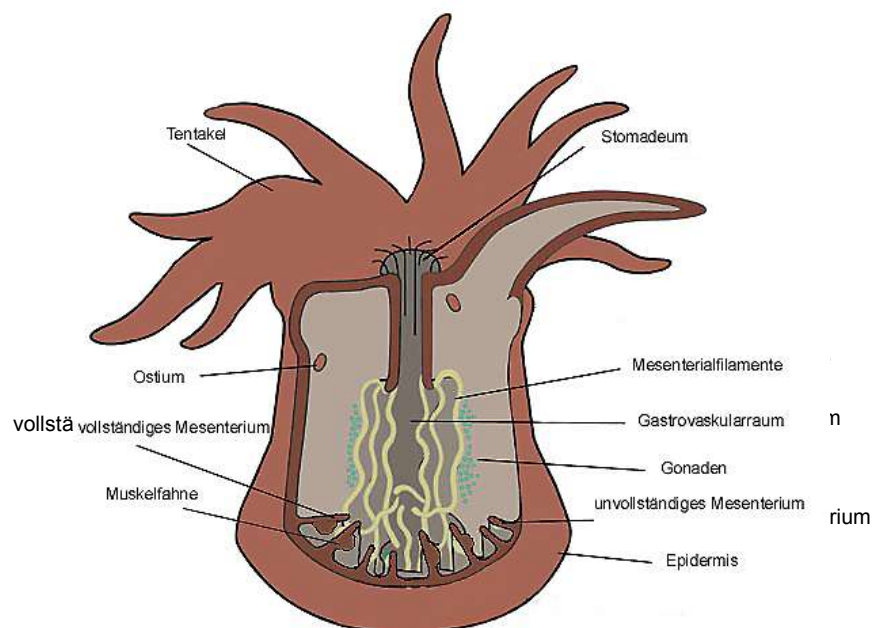


Abb.3: Schematischer Bauplan der Anthozoa.

Das Tier wird einseitig geöffnet dargestellt um den inneren Aufbau zu verdeutlichen.

Ektoderm in hellbraun; Endoderm in dunkelbraun; Mesenterien in grau; Gonaden in grün; Mesenterialfilamente in gelb. Bild: University of Michigan Museum of Zoology.

Obwohl die Cnidaria als einfache Tiere gelten, besitzen sie den am höchsten spezialisierten Zelltyp der Natur: die Nesselzellen (Cniden), die der Tiergruppe auch ihren Namen gaben. Je nach Typ dienen diese speziellen Zellen dem Beutefang, der Fortbewegung und der Anheftung an ein Substrat. Auf einen chemischen und/oder taktilen Reiz hin entladen diese Zellen ihren Inhalt in die Umgebung. Diese Entladung ist wahrscheinlich die schnellste Bewegung im Tierreich überhaupt. Trotz der hohen Geschwindigkeit handelt es sich bei der Kapselentladung um die Exozytose von Vesikeln, die auf höchste Geschwindigkeit optimiert ist (Holstein und Tardent, 1984).

### 2.3 Der Modellorganismus *N. vectensis*

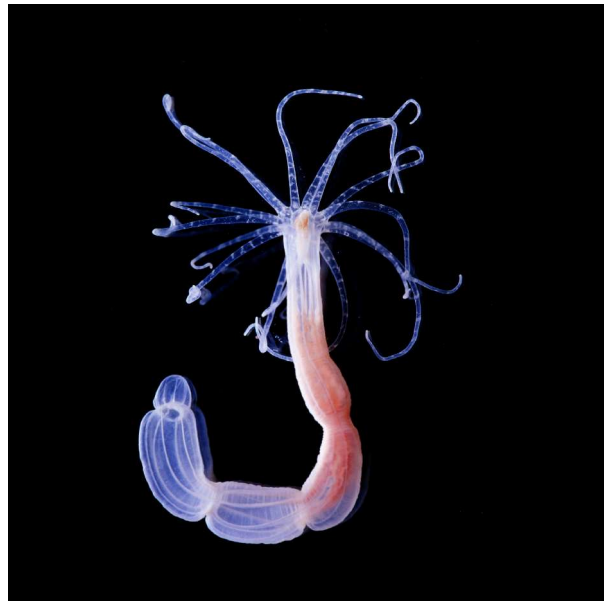


Abb.4: Adulte *Nematostella vectensis*.

Bild: Kusserow et al., 2005.

#### 2.3.1 Die geographische Verbreitung von *N. vectensis*

*N. vectensis* wurde im Jahr 1935 von T.A. Stephenson in der Brackwasserlagune von Bembridge Pond auf der englischen Kanalinsel Wight entdeckt und beschrieben. Seitdem wurden einige weitere Vorkommen in anderen Brackwasserlagunen Südostenglands, in ähnlichen Habitaten entlang der gesamten amerikanischen Pazifik- und Atlantikküste sowie im Golf von Mexiko gefunden. Eine Untersuchung der verschiedenen Genotypen der in England vorkommenden Populationen legt nahe, daß diese Population von wenigen Individuen abstammt (Pearson, 2002). Vermutlich wurden wenige Individuen von Populationen in Nordamerika nach England verschleppt und pflanzten sich asexuell fort. Der wissenschaftliche Name *N. vectensis* ist aus dem lateinischen Namen der Isle of Wight „Vectis“ abgeleitet, im Englischen wird sie auch „starlet sea-anemone“ genannt.

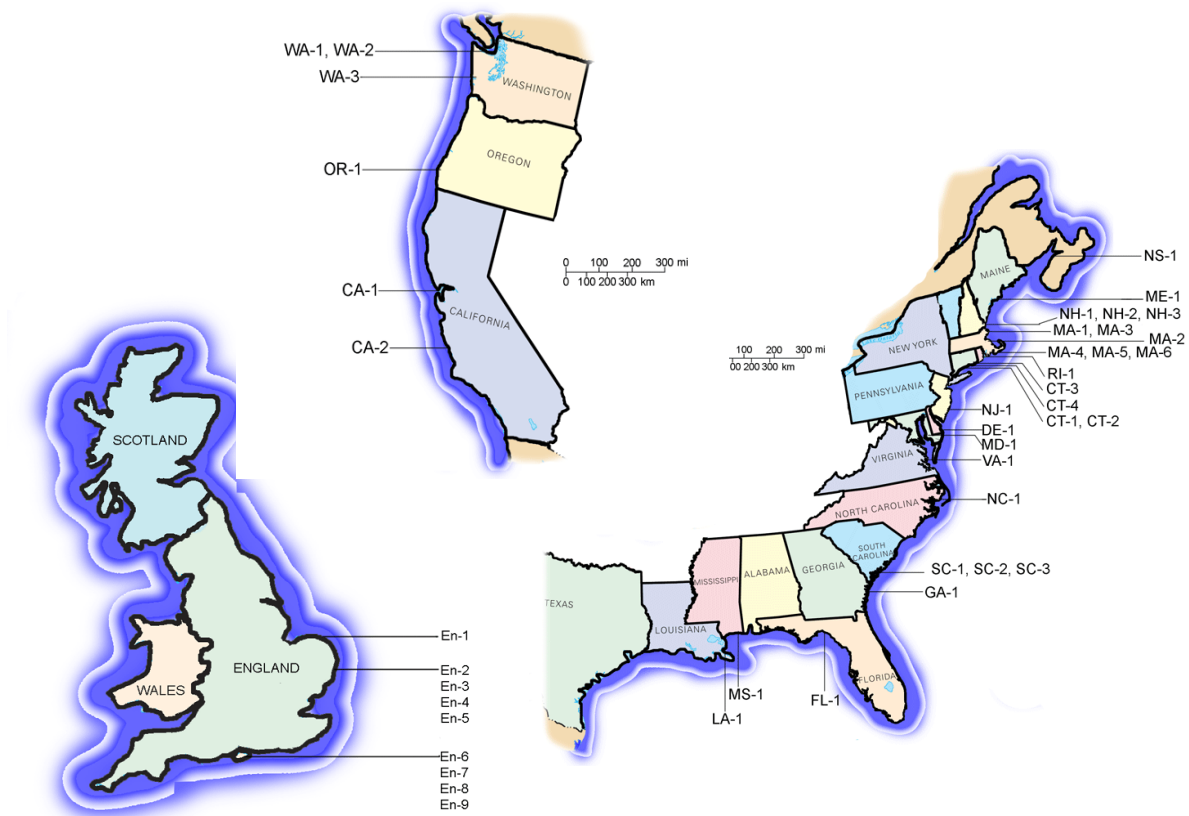


Abb.5: Geografische Verbreitung von *N.vectensis*.

En-1-9=Verbreitungsgebiete in England (Pearson et al.,2002)

WA-1-3 =Vorkommen im Staat Washington; OR-1 = Oregon; CA-1,2 = Kalifornien; NS-1 = New Schottland; ME-1 = Maine ; NH-1-3 = New Hampshire; MA-1-6 = Massachussets; RI-1 = Rhode Island; CT-1-4 = Connecticut; NJ-1 = New Jersey; DE-1 = Delaware; MD-1 = Maryland; VA-1 = Virginia; NC-1 = North Carolina; SC-1-3 = South Carolina; GA-1 = Georgia; FL-1 = Florida; MS-1 = Mississippi; LA-1 = Louisiana. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere sind Nachkommen von in Rhode River, Maryland (Hand and Uhlinger 1992) gesammelten *N.vectensis*. Bilder: [www.nematostella.org](http://www.nematostella.org).

### 2.3.2 Das natürliche Habitat

*N. vectensis* ist getrenntgeschlechtlich und lebt „gesellig“ in und auf den Sedimenten von Brackwasserlagunen, in Tiefen zwischen einem Meter bis unter einem halben Meter (Shedder et al., 1997). Gesellig heißt hier, daß zwischen 120 und 10.000 Tiere pro Quadratmeter Substrat leben, ohne daß es zu Aggressionen, Abwehrhandlungen oder Kannibalismus kommt (Shedder et al., 1997; Frank und Bleakney, 1976). Die Salinität der Habitate schwankt von 2 bis 52 ‰ (Shedder et al., 1997). Die Dichte an Tieren ist bei einer niedrigeren



Strömungsgeschwindigkeit zwischen 0,03-0,18 cm/s höher als bei größerer Fließgeschwindigkeit (Sheader et al., 1997). Die Nahrung der Tiere besteht aus Mollusken, vor allem der Gattung *Hydrobia*, Crustaceen, Nematoden, Polychaeten, Insekten sowie den Eimassen von Copepoden (Frank und Bleakney, 1978). Die meisten der ungefähr 15 bis 40 mm großen Tiere einer Population stecken bis zum Tentakelkranz in sehr feinem Sand- oder Schlammssediment.

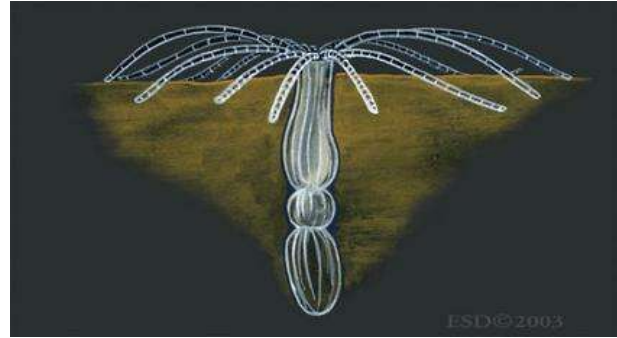


Abb.6: *N. vectensis* im Substrat.

a) Picton und Morrow, 2005; b) Myers und Burch 2001.

*N. vectensis* ist an ihre Lebensbedingungen in Brackwasserlagunen und Salzmarschen ideal angepasst und toleriert die großen Schwankungen in der Salinität und Wassertemperatur (Sheader et al., 1997), welche in ihrem Habitat infolge von Überschwemmungen sowohl durch Süßwasser (große Niederschlagsmengen) als auch durch Salzwasser (hohe Tide) mit anschließendem Wasserstandsverlust durch Verdunstung entstehen. Jedoch ist diese Anpassung auch verantwortlich für den starken Rückgang der Populationen weltweit, da ihr natürlicher Lebensraum zunehmend durch den Menschen zerstört wird. Aus diesem Grund gilt diese Tierart, wie viele andere Arten dieser Habitate auch, als stark gefährdet.

### 2.3.3 Körperbauplan von *N. vectensis*

#### 2.3.3.1 Körpersäule

Im natürlichen Habitat wird *N. vectensis* ungefähr 1,5 Zentimeter groß, unter Laborbedingungen kann sie bis zu 15 Zentimetern lang werden. Dieser

Größenunterschied kommt vermutlich durch die große Menge an Futter in der Kultur zustande. Das Tier hat adult stets acht Mesenterien und bis zu sechzehn Tentakel. Der bei Anthozoa oft stark muskulös ausgeprägte Fuß fehlt völlig. Senkrecht zur Hauptkörperachse befinden sich oft ein bis zwei leichte Einschnürungen. Entlang dieser Einschnürung teilen sich die Tiere auch ohne Fremdeinwirkung (Mire, 1998).

#### 2.3.3.2 Embryonalentwicklung von *N. vectensis*

Die weiblichen Tiere geben ihre Eier in einer Gallerte ab, die größtenteils aus Proteinen besteht. Die erste Teilung erfolgt ungefähr drei Stunden nach der Befruchtung. Jede weitere Teilung erfolgt, synchron in allen Blastomeren, jeweils ungefähr stündlich in Abhängigkeit von der Temperatur des Mediums. Es können in jedem Eipaket verschiedene Furchungstypen beobachtet werden, die ebenfalls in Abhängigkeit von der Temperatur jeweils häufiger oder seltener aufzutreten scheinen (Fritzenwanker, 2004). Möglicherweise waren zur Zeit der Trennung der Entwicklungslinien von Bilateria und Cnidaria noch keine festen Furchungsmuster etabliert. In jedem Fall entwickeln sich alle Furchungstypen zu normalen Planularlarven und Primärpolypen. Viele Vorgänge der Gastrulation von *N. vectensis* sind bislang unvollständig erklärt. Einen Tag nach der Befruchtung beginnen die Embryonen mit der Gastrulation, die sechsunddreißig Stunden nach der Befruchtung abgeschlossen ist. Ob der Punkt, an dem die ersten Zellen während der Gastrulation einwandern, an der Stelle liegt, wo das Spermium eingetreten ist oder die Polkörper abgegeben werden (Wikramanayake et al., 2003) oder durch andere Vorgänge bestimmt wird, bleibt ebenfalls umstritten. Bei der Lebendbeobachtung der Entwicklung und bei fixierten Tieren dieses Stadiums findet man jedoch regelmäßig zwei oder mehr Einsenkungen des äußeren Epithels. Gene, die früh in der Gastrulation um den Blastoporus herum exprimiert werden, kann man an allen vorhandenen Einsenkungen identifizieren. Möglicherweise ist die Festlegung des Startpunktes der Gastrulation durch physikalische Einflüsse, durch spezielle Strukturen der Blastula oder durch maternale Faktoren erst nach der Trennung der Entwicklungslinien von Cnidarian und anderen Tieren entstanden.

Eine Region von wenigen Zellen am Blastoporus reguliert die Gastrulation. Viele

bekannte Gene, die bei der Gastrulation höherer Tiere eine Rolle spielen, sind in Organisationszentren (Nieuwkoop Zentrum) am Urmund verschiedener Tiere exprimiert. Vermutlich entspricht die Region um den Blastoporus von *N. vectensis* diesem Regulationszentrum (Kusserow et al., 2005). Nach Abschluss der Gastrulation wandern Zellen mit mesenchymalem Charakter aus dem Endoderm in den Gastralraum ein, bis dieser vollständig ausgefüllt ist. Drei Tage nach der Befruchtung schlüpfen die ersten Planularlarven aus der Gallerte, die während des Schlupfes aufgelöst wird. Die Larven beginnen frei umherzuschwimmen. Fünf Tage nach der Befruchtung sind im Lichtmikroskop im Inneren des Gastralraumes zwei einander im Tier gegenüberliegende Mesenterienanlagen sowie erste Nesselkapseln sichtbar. Weitere 6 Mesenterienanlagen sind mit molekularen Markern ebenfalls sichtbar zu machen, bestehen aber zu diesem Zeitpunkt lediglich aus Reihen von Zellen, die sich morphologisch nicht von den sie umgebenden Zellen unterscheiden. Sieben Tage nach der Befruchtung durchlaufen die Tiere eine unvollständige Metamorphose, während der zunächst vier Tentakel ausgebildet werden. Bis die Tiere die vollständige Anzahl von Mesenterien und Tentakel gebildet haben und mit der Produktion von Gameten beginnen, vergehen zwei bis drei Monate ab der Befruchtung.

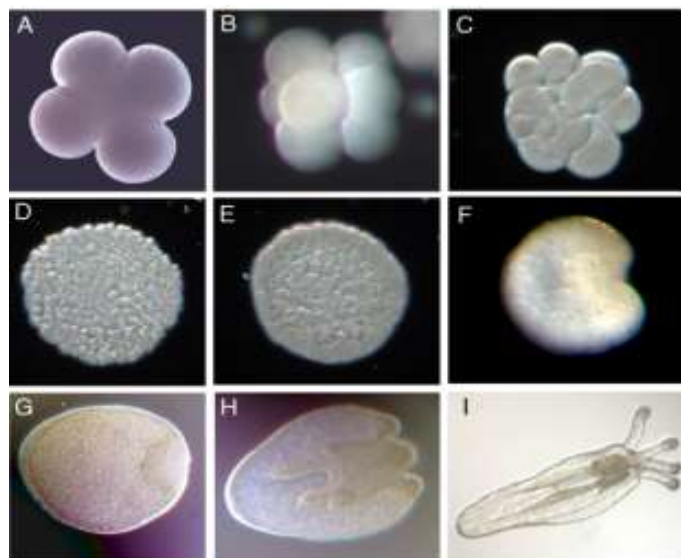


Abb.7: Embryonalentwicklung von *N. vectensis*.

a) Synzytialer Embryo mit 4 Zellkernen. Einschnürungen sind erkennbar, jedoch bleibt diese Furchung unvollständig. b) 8-Zell-Stadium. c) Morulastadium. d) Blastulastadium. e) Kompaktiertes Blastulastadium. f) Frühes Gastrulastadium. g) Frühe Planularlarve, Blastoporus rechts, der Gastralraum ist mit Nährzellen ausgefüllt h) Planularlarve, Blastoporus rechts, 2 Mesenterienanlagen sind im Gastralraum sichtbar i) Primärpolyp, Blastoporus rechts, 2 Mesenterien vollständig ausgebildet, vier Tentakel. Bilder: Fritzenwanker und Technau, 2002.

## 2.4 Die Familie der Wnt Signalmoleküle

Die sekretierten Glykoproteine der Klasse der Wnt-Liganden haben Funktionen in einer Vielzahl an Prozessen im sich entwickelnden Tierembryo. Auch in der Homöostase spielen diese Liganden eine entscheidende Rolle. Trotz der biologischen Relevanz dieser Molekülfamilie ist ihr evolutionärer Ursprung unbekannt. *N. vectensis* als basaler Metazoo sollte besonders geeignet sein, sowohl diesen Ursprung, als auch die ursprünglichen Funktionen von Wnt-Liganden in der Embryonalentwicklung von Tieren zu untersuchen.

### 2.4.1 Nomenklatur der Wnt-Liganden

Das erste Wnt-Signalmolekül wurde im Rahmen einer systematischen Suche nach künstlich erzeugten Mutationen der Individualentwicklung in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Aufgrund des Phänotyps wurde das zugehörige Gen „wingless“ genannt. Zur gleichen Zeit wurden verwandte Moleküle bei der Maus identifiziert, da sich ein Retrovirus in eines dieser Gene integriert. Diese Molekülgruppe wurde „int-1“ Faktoren für mouse mammary virus integration site type 1 genannt. Aus der Zusammenfassung dieser beiden Bezeichnungen entstand der Name Wnt. Die Subfamilien der Wnt-Liganden wurden in der Reihenfolge ihrer Identifizierung aufsteigend nummeriert. Einige Wnt-Liganden können keiner der Orthologiegruppen zugeordnet werden diese tragen nach wie vor ihre ursprüngliche, anderen Nomenklaturen folgende Bezeichnung. So gehören die Transkripte egl-20, mom-2 und lin-44 aus *Caenorhabditis elegans* der Großfamilie der Wnt-Liganden an. In einigen der Subgruppen kommen in zwei Transkripte vor. Diese werden mit dem Zusatz A bzw. B bezeichnet.

### 2.4.2 Proteinstruktur der Wnt-Liganden

Wnt-Liganden besitzen ein charakteristisches Muster von zweiundzwanzig bis vierundzwanzig Cystein-Resten, die unter anderem die räumliche Struktur des Liganden durch Disulfidbrücken definieren. Wnt Liganden werden posttranslational modifiziert (Willert et al., 2003; Smolich et al., 1993; Tanaka,

2002). Am carboxyterminalen Ende der Moleküle befinden sich mehrere Glykolisierungsstellen. Solche Glykolisierungen sind insgesamt bei sekretierten Proteinen häufig und steuern die intrazelluläre Verteilung (Fleischer 1983, West, 1986). Am dritten der konservierten Cysteinreste wird vermutlich bei allen Wnt-Liganden nach der Translation ein Palmitinsäurerest angehängt, der für die Funktion des Moleküls als Signal essentiell ist (Willert et al., 2003). Erst seitdem dieser Umstand bekannt ist, gelang es Proteine dieser wichtigen Gruppe effizient aufzureinigen und für weiterführende Experimente zu verwenden. Bislang konnte jedoch keines der bekannten Wnt-Proteine kristallisiert werden. Am aminoterminalen Ende der Wnt Liganden befindet sich nach der Translation ein Signalpeptid, das für die Sekretion des Moleküls in den extrazellulären Raum verantwortlich ist. Ist der Ligand im Exozytosevesikel, wird das Signalpeptid vom aktiven Ligand abgetrennt.

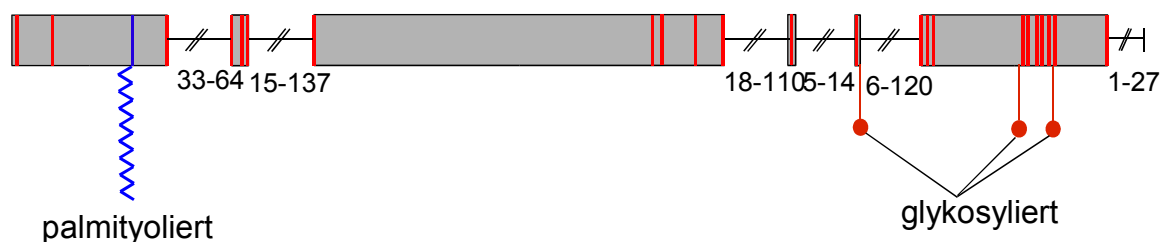


Abb.8: Schematische Übersicht über ein konsensus-Wnt Protein.

Graue horizontale Felder markieren Bereiche, deren Länge konserviert ist.

Schwarze horizontale Linien symbolisieren unterschiedlich lange, gering konservierte Bereiche zwischen hochkonservierten Abschnitten (Zahlenangaben geben jeweils die kürzeste und die längste an dieser Stelle eingefügte Aminosäuresequenzen aus unterschiedlichen Wnt-Sequenzen an).

Rote vertikale Linien markieren die 24 konservierten Cysteinpositionen. Die blaue vertikale Linie markiert die posttranslationale Palmitoylierungsstelle (Cystein). Die blaue vertikale Zickzacklinie symbolisiert den kovalent verbundenen Palmitinrest. Rote Symbole zeigen glykosidische posttranslationale Modifikationen.

### 2.4.3 Von Wnt-Liganden ausgelösten Signalkaskaden

Bei der  $\beta$ -Catenin abhängigen Wnt-Signalkaskade (kanonischer Wnt-Signalweg) bindet das sekretierte Wnt-Signalmolekül unter Mithilfe eines membranständigen Corezeptors (LRP5/6) an einen Rezeptor der Frizzled (fzd) sieben-transmembran-Rezeptortyrosinkinaseklasse. Daraufhin phosphoryliert die Rezeptortyrosinkinase

fzd das Multifunktionsmolekül Dishevelled (Dsh). Dies wiederum bewirkt die Auflösung eines Multiproteinkomplexes. Dieser Komplex markiert normalerweise frei im Zytosol verteiltes  $\beta$ -Catenin durch Phosphorylierung zum Abbau durch den Proteasomen Proteindegradationsweg. Bei der Bindung von Wnt an fzd steigt daher die intrazelluläre Konzentration von  $\beta$ -Catenin. Erreicht die  $\beta$ -Cateninkonzentration ein kritisches Niveau, bindet es an den Transkriptionsfaktor Tcf und reguliert die Expression nachgeschalteter Gene. Diese Kaskade ist während der frühen Embryogenese von Wirbeltieren an der Differenzierung von Zellen entlang der Körperachsen beteiligt. Werden Komponenten der Signalkaskade, die zur Vermehrung von freiem  $\beta$ -Catenin führen, durch Injektion von mRNA überexprimiert, wird die Hauptkörperachse sowie Kopfstrukturen dupliziert (Sokol et al., 1991). Bislang wurden 55 Komponenten dieses Signalweges identifiziert, die Einfluß auf die Zellantwort haben.

Der planare Zellpolaritätssignalweg (PCP) wurde in *Drosophila melanogaster* bei genetischen Studien entdeckt (Mlodzik, 1999). Kutikulazellen des Drosophila Flügels sekretieren Haare, die alle in eine Richtung weisen. Bei Störung eines Wnt-Genes verändert sich deren Orientierung. Ausgelöst wird auch diese Signalkaskade durch Bindung eines Wnt-Liganden an fzd, hier jedoch ohne Mithilfe von LRP5/6. Ebenfalls wird Dsh phosphoryliert, vermutlich jedoch an anderen Positionen. Dies wiederum aktiviert CDC42, ein G-Protein-bindendes Protein der CDC42/Rho Familie, das den Transkriptionsfaktor Jun aktiviert. Die Folge sind Rearrangements des Zytoskelettes. Aktivierung des PCP-Signalweges führt während der Gastrulation der Vertebraten zur Polarisation von wandernden Zellen. Diese bilden daraufhin Lamellipodien für eine gerichtete Wanderung (Wallingford et al. 2000).

Durch Überexpression von *XWnt11* in *Xenopus laevis* Embryos werden schwere Gastrulationsdefekte erzeugt, da eine korrekte Trennung der Keimblätter nicht gelingt (Ku und Melton, 1993). In unreifen unbefruchteten *Xenopus laevis* Eiern ist *XWnt11* mRNA gleichmäßig im Zytoplasma des Eis verteilt. Während der Eireifung wird sie am vegetativen Pol des Eis cortical deponiert. Später verliert die mRNA die Bindung an den Cortex des Eies, nicht aber die vegetative Lokalisation. Im Achtzellstadium ist die mRNA in den vegetativen Zellen des Embryos zu finden. In der späten Blastula findet man das *XWnt11*-Transkript in den dorsalen Bereichen des Embryos. Zu diesem Zeitpunkt handelt es sich um zygotisch

exprimiertes Transkript (Schroeder et al., 1999). Zygotische *XWnt11* mRNA spielt eine Rolle bei der Entstehung des Nieuwkoop Zentrums und den konvergenten Extensionsbewegungen während der Gastrulation. Die maternale Expression scheint mit der Definition der ersten Symmetrieachse des Eies und des sehr frühen Embryos in Verbindung zu stehen (Ku und Melton, 1993).

Viele Hinweise sprechen für die Existenz eines weiteren, durch Wnt-Liganden ausgelösten Wnt-Signalweges, den Proteinase C abhängige Wnt-Signalweg (PKC). Wnt5 kann an *fzd-2* binden, was  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen freisetzt. Dies wiederum aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Enzyme, darunter Proteinkinase C (PKC) (Slusarski et al., 1997; Sheldahl et al., 1999; Kühl et al., 2000). Die Reduktion von *fzd-7* mRNA in Explantaten verändert das Zelladhäsionsverhalten. Durch Überexpression von PKC, nicht aber einer der Komponenten des kanonischen- oder PCP-Signalweges kann das normale Adhäsionsverhalten wieder hergestellt werden (Winklbauer et al., 2001). Sowohl die nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren, als auch die eventuell vorhandenen weiteren Komponenten sind unbekannt.

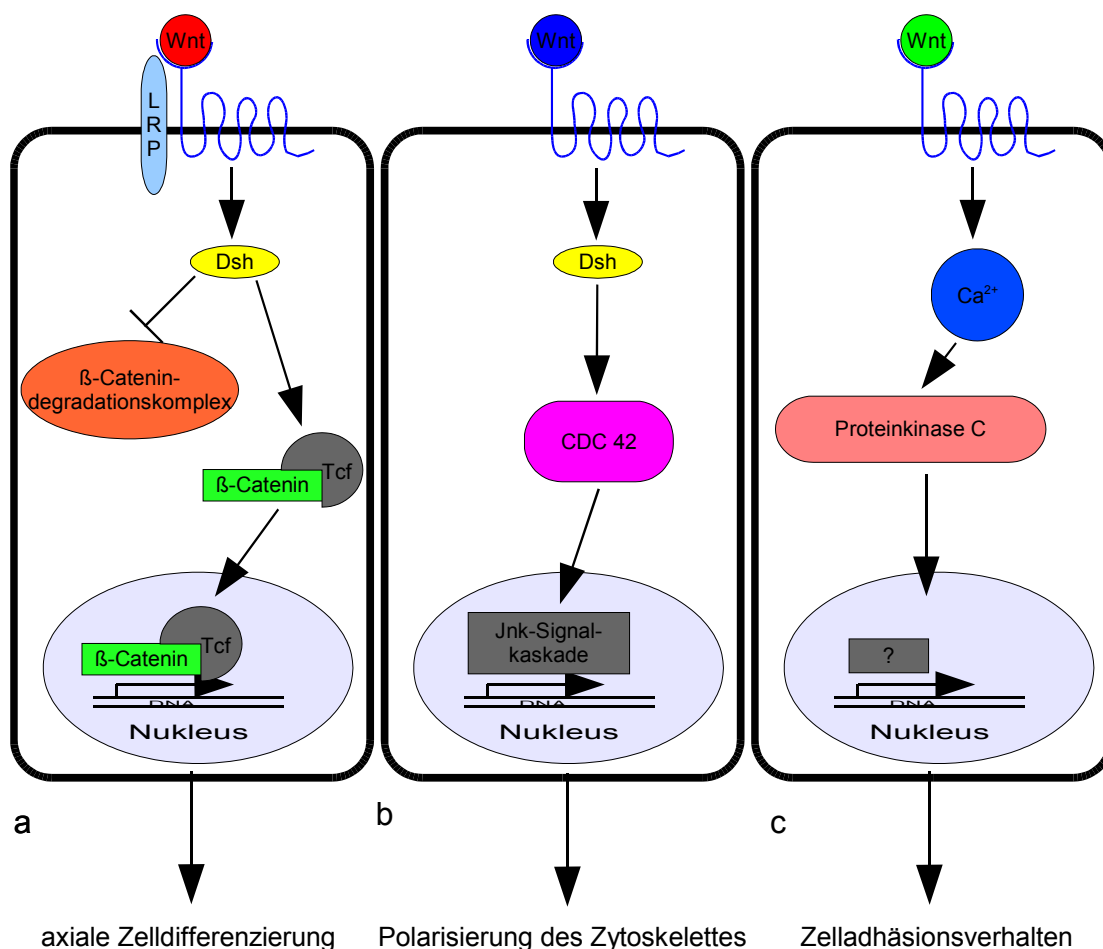


Abb.9: Schematische und vereinfachte Übersicht der bekannten Wnt-Signalkaskaden.

- a)  $\beta$ -Catenin abhängiger Wnt-Signalweg: Wnt-Bindung an fzd erhöht die zytosolische  $\beta$ -Cateninkonzentration. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an Tcf führt zur Kernlokalisation und zur Regulation von nachgeschalteten Genen.
- b) PCP Signalweg: Wnt Bindung an fzd aktiviert CDC42 und die Jnk-Kaskade, dies führt zur Veränderung der Genexpression.
- c) PKC Signalweg: Bindung von Wnt an fzd bewirkt eine Erhöhung der zytosolische  $Ca_{2+}$  Konzentration wodurch PKC aktiviert wird. Über einen bisher unbekannten Mechanismus werden nachgeschaltete Gene reguliert.

#### 2.4.4 Interaktionen der Wnt Signalwege untereinander und mit anderen Signalwegen

Neben der offensichtlichen Verbindung zu Mechanismen der Zell-Zelladhäsion über  $\beta$ -Catenin, gibt es auch solche zum Jun-Kinase Signalweg, der ebenso wie die Wnt Signalwege ein stark konservierter Mechanismus ist. Diese beiden sowie wenige andere solche Signaltransduktionskaskaden steuern die Embryonalentwicklung aller Tiere (Schoenwolf, 2002; Weiss 2005). Neben den Verbindungen zu anderen Signalkaskaden sind die Wnt-Signalwege auch untereinander verknüpft. So regulieren sie sich über Feedbackschleifen auf mehreren Ebenen selbst. Dreißig (Dasgupta et al., 2005) der fünfundsiebzig bekannten Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges haben funktionale Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Tcf in ihrem Promotor. Auch die verschiedenen Wnt Signalwege regulieren sich gegenseitig. So konnte gezeigt werden, daß in *Brachydanio rerio* das Abschalten der maternalen Wnt5 mRNA zur ektopischen Aktivierung von  $\beta$ -Catenin führt (Westfall et.al., 2003a). Wnt5 kann anscheinend, in Abhängigkeit des zellulären Kontextes, den kanonische Wnt Signalweg sowohl positiv als auch negativ regulieren (Mikels und Nusse Programm des „Wnt meeting 2004“). Wnt5 Überexpression kann den Wnt3 Signalweg inhibieren. Diese Inhibition ist unempfindlich gegenüber Pertussis Toxin, das G-Protein-vermittelte Signalkaskaden wie den  $\beta$ -Catenin abhängigen – und den PCP-Wnt-Signalweg blockiert. In der Maus ist die Chondrogenese in den Spitzen der sich entwickelnden Gliedmaßenknospen von der Inhibition von  $\beta$ -Catenin vermittelten Signalen durch ein wnt5 Ortholog abhängig (Topol et.al. 2003).



#### 2.4.5 Die Rolle von Wnt Liganden bei Erkrankungen des Menschen

Störungen in der Kontrolle der Wnt-Signalkaskaden führen zu einer Vielzahl von Erkrankungen (Nelson et al., 2004). Daher wird intensiv an der Aufklärung der Zusammenhänge geforscht. So spielen Defekte, die zu einer konstitutiven Anschaltung von Wnt-Signalwegen führen, eine Rolle bei der Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einer autosomal dominant vererbten Krebserkrankung des Darms. Diese Erkrankung entsteht meist durch eine verkürzte Version des Proteins Adenous Polyposis Cancer of the Colon (APC). Dies führt zur Aktivierung des Wnt-Signalweges an falschen Stellen im Körper (Kinzler et al., 1991; Nishisho et al., 1991). Weitere Mutationen in den Genen für  $\beta$ -Catenin und APC konnten in vielen Darmkrebserkrankungen und auch vielen anderen Tumortypen als Ursache für Erkrankungen identifiziert werden (Giles et al., 2003). Auch Mutationen im Gen für Axin, ebenfalls eine Komponente des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalweges, führen zu Krebserkrankungen des Menschen wie hepatozelluläre Karzinome (Sato et al., 2000). Tetraamelia, eine seltene Erkrankung des Menschen, die sich durch das Fehlen von Gliedmaßen manifestiert, entsteht durch eine Mutation im Wnt3 Gen des Menschen (Niemann et al., 2004). Eine Punktmutation im Gen für den Wnt Corezeptor LRP5 konnte als Ursache für eine ungewöhnlich hohe Knochenmasse an ganz bestimmten Positionen des Körpers, wie dem Kiefer und dem Gaumen, identifiziert werden (Little et al., 2002; Boyden et al., 2002). Diese Mutation verhindert die Bindung von LRP5 an den Wnt-Antagonisten Dickkopf (Dkk). Unter anderen Bedingungen führen andere Mutationen im selben Gen auch zum Gegenteil, einer geringeren Knochenmasse (Gong et al., 2001). Beides spricht für eine Funktion des kanonischen Wnt-Signalweges in der Steuerung der Knochendichte. Möglicherweise spielt eine Mutation im Wnt5B Gen eine Rolle in der Entstehung von Typ2 Diabetis. Polymorphismen einzelner Nukleotidpositionen (SNP) in 11 menschlichen Wnt-Genen wurden auf ihre Häufigkeit bei Patienten mit dieser Erkrankung untersucht, wobei ein hoher Signifikanzwert für einen bestimmten SNP im *HsWnt5B*-Gen errechnet wurde (Kanazawa, 2004). Auch in der Genese des Müllerschen Gangs, bei der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane spielen Wnt-Signale eine Rolle. Eine Punktmutation im *HsWnt4*-Gen ist verantwortlich für das Fehlen des Müllerschen Gangs und einem androgynen

Äußeren, den Symptomen des Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndroms (Biason-Lauber et al., 2004). Heutzutage wird Krebs oft als eine Erkrankung des Stammzellsystems betrachtet (Taipale und Beachy, 2001). Diese Sichtweise wird durch viele Studien gestützt. So führt im Dickdarm des Menschen sowohl der Verlust der TCF4- als auch der Dkk-Expression zum Verlust von Stammzellen (Korinek et al., 1998; Pinto et al., 2003; Kuhnert et al., 2004). Diese Befunde zeigen deutlich den großen Einfluss von Wnt-Signalen auf die Entstehung und Aufrechterhaltung des Körpers und auf dessen Gesundheit.

## 2.5 Wnt-Liganden in Cnidaria

Um den evolutionären Ursprung des Wnt Signalweges und seiner Komponenten zu untersuchen, ist der Tierstamm der Cnidaria aufgrund seiner basalen Stellung innerhalb der Metazoa besonders geeignet. Die Ausprägung der einzigen Körperachse könnte durch einen einzelnen, ursprünglichen Mechanismus des Wnt-Signalweges ermöglicht werden. Ein einzelner Vertreter der Wnt-Liganden aus dem Phylum Cnidaria wurde in dem Hydrozoa *Hydra vulgaris* identifiziert (Hobmayer et al., 2000). Phylogenetische Berechnungen ergaben, daß dieses Molekül nicht dem Vorläufermolekül aller bekannten Wnt-Liganden entsprechen kann, da es spezielle Sequenzmuster besaß, die nur in einer der 12 Subgruppen dieser Molekülklasse vorkommen. Daraus musste man schließen, daß es in *Hydra vulgaris* und anderen Cnidaria noch weitere Moleküle der Wnt-Großfamilie geben muß oder andere dieser Gene sekundär in der Evolution verloren gegangen sind. In jüngster Zeit wurden Fragmente von weiteren vier Wnt mRNA Molekülen aus verschiedenen EST-Genbanken (Holstein; Bode) (expressed sequences tags) sequenziert.

## 2.6 Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit

Die Anthozoa gelten als basale Gruppe der Cnidaria (Bridge et al., 1995). Aus dem Anthozoo *N. vectensis* konnten im Rahmen einer Diplomarbeit (Sturm, 2000) sechs verschiedene Sequenzfragmente putativer Wnt-Liganden aus revers transkribierter mRNA isoliert werden. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, diese Wnt mRNA Fragmente sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung zu

vervollständigen. Die gewonnenen Sequenzen sollten durch komputergestützte Berechnungen den homologen Sequenzen aus anderen Organismen zugeordnet werden, um die evolutionäre Herkunft dieser wichtigen Molekülgruppe aufzuklären. Des weiteren sollten der Zeitpunkt der Expression dieser Gene in der Individualentwicklung von Embryonen und die räumliche Verteilung der mRNA im sich entwickelnden Tier bestimmt werden. Abschließend sollten Studien über die Funktion dieser Gene in *N. vectensis* durchgeführt werden und mit der Funktion dieser Moleküle in anderen Tiere verglichen werden.

### 3. Ergebnisse

Sekretierte Wnt-Signalmoleküle haben eine große Bedeutung für Musterbildungsprozesse in höheren Metazoen (Cadigan und Nusse, 1997). Mehrere Mitglieder dieser konservierten Molekülfamilie konnten in Cnidaria (*Hydra vulgaris* und *N. vectensis*) identifiziert werden (Hobmayer et al., 2000; Sturm, 2000). Um den evolutionären Ursprung und die Diversifikation dieser Ligandenfamilie im Verlauf der Evolution zu komplexen Organismen zu untersuchen, sollten die kurzen aus *N. vectensis* bekannten Wnt-Transkriptsequenzen (Sturm, 2000) vervollständigt werden um eine molekulare Phylogenie dieser Proteinfamilie zu erstellen.

#### 3.1 Bekannte Transkriptbereiche für Wnt-Liganden aus *N. vectensis*

In der Diplomarbeit von Karsten Sturm (2000) „Klonierung und Charakterisierung von  $\beta$ -Catenin / Wnt-Homologen aus *N. vectensis*“ konnten durch einen Ansatz mit degenerierten Primern 6 putative Wnt-Transkriptfragmente identifiziert werden. Aus der Arbeit von Karsten Sturm (2000) lagen folgende PCR-Fragmente vor:

##### NvWnt1:

```
5' -TGGCATTGGGGTGGGTGCAGTGATAACATCCATTTTGCAGACAACTTTT
      W H W G G C S D N I H F A D N F
CAAAGCGCTTTGTAGACGCACAAGAAAAAGGACGGGATTTCCGTGCTCAGAT
S K R F V D A Q E K G R D F R A Q I
CAACTTGCACAATAACAACGCCA-3'
      N L H N N N A
```

##### NvWnt4:

```
5' -TGGCAGTGGGGAGGTTGCAGTGACGACATCGACTTCGGCATGACCTTTG
      W Q W G G C S D D I D F G M T F
CCACGCGATTCTGTGGACGCGCGAGCGTGGAAGCGGGATTGGCAGTCCCGC
A T R F V D A R E R G S G I G S P A
GCGCGTGTGATGAATTTGCATAATAACCAAGCCGG-3'
      R V L M N L H N N Q A
```

**NvWnt7a:**

5' - **TGGGAGTGGGGTGGGTG**CAGCGTCAATATTGGCCACGGCTTGGCGGTGG  
 W E W G G C S V N I G H G L A V  
 CCAAGGAGTTCTTAAATGCGAACGACGCGGTCAGGAGCGATATAGCCCTGAT  
 A K E F L N A N D A V R S D I A L M  
**GAATCGCCACAACAACGCAGGA**-3'  
 N R H N N N A G

**NvWnt10:**

5' - **TGGGATTGGGGGGGATG**TGGCGATAATATTGACTACGGCATTGAAACGT  
 W D W G G C G D N I D Y G I E T  
 CTGCCAAATTTTTGGACTCGCGCGAGAAAGGACGAGATTTACACTCCATGAT  
 S A K F L D S R E K G R D L H S M M  
**GAACATGCACAATAACAACGCAGG**-3'  
 N M H N N N A

**NvWnt11:**

5' - **TGGGAGTGGGGTGGGTG**CCATGACAACATAGCTCGGGGCATGCGCTTTA  
 W E W G G C H D N I A R G M R F  
 GCAAAGACTTCACGGACGCGGTGGAAGCTCAGCGCATGAGGAAACACAAATC  
 S K D F T D A V E A Q R M R K H K S  
 GATGGCCGTGGCTCTGATG**AACCTGCATAACAACAACGCTGGA**-3'  
 M A V A L M N L H N N N A G

**NvWntA:**

5' - **TGGCATTGGGGTGGATG**CAGCGAAAACGTGGGGCATGGGGACGATTTCT  
 W H W G G C S E N V G H G D D F  
 CACGCAAATTCATGGACCCAGAGCCGCCGCGCAAAGAATTGGAATACCTGTT  
 S R K F M D P E P P R K E L E Y L L  
**GGTGAAGCATAACAACAACGCAGGA**-3'  
 V K H N N N A G

Abb.10: Sequenzfragmente aus der Diplomarbeit von Karsten Sturm (Sturm, 2000).  
 Sequenzen der zuvor identifizierten Transkriptfragmente mit der korrespondierenden  
 Aminosäuresequenz. Bindestellen der degenerierten Primer sind in blau markiert.

Degenerierte Primer stellen ein Gemisch verschiedener Oligonukleotide dar.  
 Daher wird die Sequenz des am besten bindenden Primer dem Produkt

aufgezwungen. Die Sequenz des Amplifikationsproduktes entspricht daher nicht der tatsächlichen Sequenz des Genes.

Aus der Sequenzierung einer EST-Genbank (Holstein und Technau) wurde ein weiteres Wnt-Transkriptfragment identifiziert. Die EST-Bank wurde aus einer gemischten cDNA aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien gewonnen, die durch reverse Transkription mit einem oligo-dT-Primer synthetisiert wurde.

```
5' -TTGGATTGTTTTCTTGCATTACACAGCTAACAGAGAGACAGCCTTCGTAC
      L D C F L A F T A N R E T A F V
ACAGTATAAATACCGCAGCCGTCACGTATTTCTTAACCAGGGACTGTAGGAG
H S I N T A A V T Y F L T R D C R R
AGGCATCTTTAGGAATTGCGCGTGTGTGCGACAGACGGGCCAAGCTGGAGAA
      G I F R N C A C V R Q T G Q A G E
TGCGGGGGGTGCAACGACAATGTCAAGTTTGGTGAAGTGCTTTCCAAACACT
      W R G C N D N V K F G E V L S K H
TCCTAAACGCCCCGCCATGTGGACAAGCGCAAGGCCAGAGCGGTCATCCATTT
F L N A R H V D K R K A R A V I H L
GCACAACAACGCTGTTGGGCGCAAAGCTGTTAAGAAGACTTTAAAGCAACAG
      H N N A V G R K A V K K T L K Q Q
TGCAAGTGCCACGGCGTGTCCGGCGGATGTTTCGAGCAAAAGCTGCTGGAAAA
      C K C H G V S G G C S S K S C W K
CACTGCCACTGTTT-3'
```

Abb.11: Sequenzfragment aus der *N. vectensis* EST-Bank (Holstein und Technau).

Sequenz des in einer EST-Genbank identifizierten Transkriptfragments mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz.

### 3.2 Vervollständigung von Wnt Transkriptsequenzen aus *N. vectensis*

#### 3.3

Die schon bekannten Wnt-Transkriptfragmente sollten in 5'- und 3'-Richtung komplettiert werden. Die Zugehörigkeit dieser Transkripte zu bekannten Subfamilien dieser großen Molekülfamilie sollten in Stammbaumberechnungen untersucht und Hinweise auf die evolutionäre Herkunft dieser Signalproteine gesammelt werden. Durch 5'-RACE-PCR wurden cDNA Fragmente gewonnen,

die 5'-seitig der schon bekannten Fragmente lagen, durch 3'-RACE Fragmente des 3'-Bereichs. Die gewonnenen Klone wurden sequenziert (Fa. GATC) und anhand überlappender Sequenzbereiche aus den unterschiedlichen PCR-Reaktionen (5'-RACE, 3'-RACE und PCR mit degenerierten Primern) zu möglichst vollständigen Transkriptsequenzen zusammengesetzt. Die identifizierte Transkriptsequenzen wurden der NCBI Datenbank übermittelt (Genbankzugangskennzeichnungen befinden sich auf Seite 100 in Material und Methode 5.6).

Transkript	5'-RACE-Fragment	3'-RACE-Fragment	Gesamtlänge	ORF	5'-UTR	3'-UTR	AS
<i>NvWnt1</i>	626 b	1539 b	2106 b	1095 b	43 b	968 b	364 AS
<i>NvWnt4</i>	559 b	1012 b	1584 b	1065 b	52 b	467 b	354 AS
<i>NvWnt7a</i>	682 b	951 b	1581 b	1038	268 b	434 b	345 AS
<i>NvWnt8a</i>	-	229 b	>834	761 b	73 b	?	253
<i>NvWnt10</i>	720 b	949 b	1663 b	1050 b	196 b	417 b	351 AS
<i>NvWnt11</i>	497 b	675 b	1285 b	1056 b	125 b	>104 b	343 AS
<i>NvWntA</i>	574 b	977 b	1549 b	1089 b	34	417 b	367 AS

Tab.1: Übersicht über die identifizierten Wnt- Transkriptsequenzen.

Aufgeführt sind die Längen der identifizierten DNA-Fragmente aus den 5'-RACE, 3'-RACE, die Gesamtlänge der Transkripte, die Länge des kodierenden Bereiches (ORF), des 5'-untranslatierten Bereiches (5'-UTR), des 3'-untranslatierten Bereichs (3'-UTR) und die Länge der kodierten Aminosäuresequenz (AS). Längen sind in Nukleotiden (b) und Aminosäuren (AS) angegeben. (?) Das *NvWnt8* Transkript ist vermutlich 3' seitig länger als die identifizierte Sequenz .

Am 3'-Ende des *NvWnt11*-Transkriptes konnte bislang keine Poly-Adenosinsequenz amplifiziert werden, daher ist die identifizierte Sequenz vermutlich am 3'-Ende unvollständig. Der sequenzierte Bereich dieses Transkriptes geht jedoch 104 b über das Stopkodon (TGA) hinaus, daher ist der kodierende Bereich vollständig. Ebenfalls unvollständig ist die Transkriptsequenz von *NvWnt8a*. Dieser Sequenz fehlt ein Startkodon (ATG). Vor der in der vorliegenden Arbeit angegebenen kodierenden *NvWnt8a*-Sequenz befindet sich im kodierenden Leserahmen ein Stopkodon (TAA). Auch in den anderen Leserahmen befinden sich Stopkodone. Ob es sich hierbei um einen technischen Artefakt handelt ist bislang ungeklärt. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen









<u>CGAGCYCCCAAAcCCAGGRGCATATATTACGGTTMAGTTGCCTTGAGAGA</u>	1550
<u>ATAAAAATGCGTAGTTTTGAATATAGGAATATAGKCCGGTTAGAAATACT</u>	1600
<u>TTATCTTTACGTTTTTKTCACGKGATKTTCTGTATGCAGATGCAGGkTTTT</u>	1650
<u>TGAGAAGGAGATAACTTAGGGACCGACGATTTAKTATCCGACAGGAAGGC</u>	1700
<u>TACTGGTCTGGTCGATTTTTGTCTAGGATATTGTTTATAATTCTCCCCAG</u>	1750
<u>AAAACTTTAAGGCGGTCCGAAGCTATTATCTATAGATCTATAGAGATAAA</u>	1800
<u>ACAAATACCACAGGCACGTAGCCCAGGATAATGAAAAGGTCTAATATCVA</u>	1850
<u>GGCGTGACCATCCTACTTAAGAAATAGCCAACCTTATTGCCGTAAGAqGGG</u>	1900
<u>GTTAGGSNTGVVAAAqGGGGTTCGCTACGTGCTTGTACCATATGTGCATA</u>	1950
<u>TGTCCATCCATATCAAAAAAGAACAATAATAAATAGTTTGGATGTAAATA</u>	2000
<u>GTTTTATGCTGAGGAGACTTGTAGTAGATCTATGTTAAATATGTGAGCA</u>	2050
<u>CATTTAGAATAAAGTATCATGCATAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	2100
<u>AAAAAA</u>	2106

Abb.12: Übersicht über die Transkriptsequenz von *NvWnt1*.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer. Der mit degenerierten Primer identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen. Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

***NvWnt4*:**

<u>GAAAAGAAGGAAGCCTTCATTGCAACG</u>	<u>NvWnt4-ORF-5'-a</u>		50
<u>CAGTGTTCGCTGTTCA</u>			
<u>CGTTCAA</u>			
<u>TAATG</u>	<u>NvWnt4-ORF-5'-a</u>		100
ATCGCACTTAAGATTGTTATTCTGACGCAGTTGGTAATGGCTTCG			
M I A L K I V I L T Q L V M A S			
CTAGTGTACTCAAGTCAATGGCTATCGTTAGCGCTCACTGGAAGTAACCC			150
L V Y S S Q W L S L A L T G S N P			
AAATAGATTCTTATCCAAGAAAACTGTGACGAGATCGGCCAGCTGTCGA			200
N R F L S K K N C D E I G Q L S			
ATCATCGCCAGGTCCAAGTATGCAAGCGGAACATCCAGGTCATGGACAGT			250
N H R Q V Q V C K R N I Q V M D S			
GTGAAAGACGGGGCAAGCGTCGCACTGTTTCGAGTGCCAACACCAGTTCCG			300
V K D G A S V A L F E C Q H Q F R			
CTATCGCCCGTGGAAGTGCCTACGGTGCAGTTCAGCAGGTCACCCGTCT			350
Y R P W N C T T V Q F S R S P V			

TTGGAAACTCTATCAATGGAGGGACACGCGAGGCCGCGTTTGTACACGCC 400  
 F G N S I N G G T R E A A F V H A  
 ATATCATCTGCCGGCGTTGCGTACGCAGTCACTCAGGCGTGACAGCTCCGG 450  
 I S S A G V A Y A V T Q A C S S G  
 GAGACTGGGCCAAAAGTGCGGATGCGACAGGAAGACACGTGGTCAGGCTG 500  
 R L G Q K C G C D R K T R G Q A  
 ACGGC TTCAATTGGGGCGGGTGCAGTGACGACATCGACTTCGGCATGACC 550  
 D G F N W G G C S D D I D F G M T  
 NvWnt4-3'-RACE-a NvWnt4-3'-RACE-a NvWnt4-5'-RACE-a  
TTTGCCACGCGATTTCGTGGACGCGCGCGAGCGTGGAAGCGGGATTGGCAG 600  
 F A T R F V D A R E R G S G I G S  
TCCCGCGCGCGTGTGATGAATTTGCATAATAACAGAGGCGGAAGACTGG 650  
 P A R V L M N L H N N R G G R L  
 CCGTTAGAAAGTTCATGGACTTGCAGTGCAAATGCCACGGGGTATCCGGC 700  
 A V R K F M D L Q C K C H G V S G  
 TCGTGCAACATCAAAACCTGCTGGCGAGCTTTACCGAACTTTAGAATCGT 750  
 S C N I K T C W R A L P N F R I V  
 CGGCGACTACATAAAAGAGAAATTCGATGGAGCTACTGAGGTCGAGTACA 800  
 G D Y I K E K F D G A T E V E Y  
 AACTAATAGGCGGGAAACACGTGCTTGTGCCCCAAAATCGCAAATATAAA 850  
 K L I G G K H V L V P K N R K Y K  
 CCTCACACTCAAATGGACCTGGTGTATCTGGTACAGTCACCCGACTTCTG 900  
 P H T Q M D L V Y L V Q S P D F C  
 CGAACCCAACCCTAAGACTGGTTCCTTAGGGACACAAGGACGCATCTGTA 950  
 E P N P K T G S L G T Q G R I C  
 ATCGGACATCTCAGGCGATTGACGGGTGCGACTTGATGTGCTGCGGGCGT 1000  
 N R T S Q A I D G C D L M C C G R  
 GGCTACGTCTCTCGCACGGAAGTGAGGCAGGAGCAATGCGCGTGCAAGTT 1050  
 G Y V S R T E V R Q E Q C A C K F  
 CTTCTGGTGTGTACGTGAGATGCCAGACATGCATGCGGAGAGTCGAGG 1100  
 F W C C H V R C Q T C M R R V E  
 NvWnt4-ORF-3'-i  
 TGAGCTATTGCAAA TAACCACCAAATATC ACCGAATATTCACTGAAGATC 1150  
 V S Y C K \*

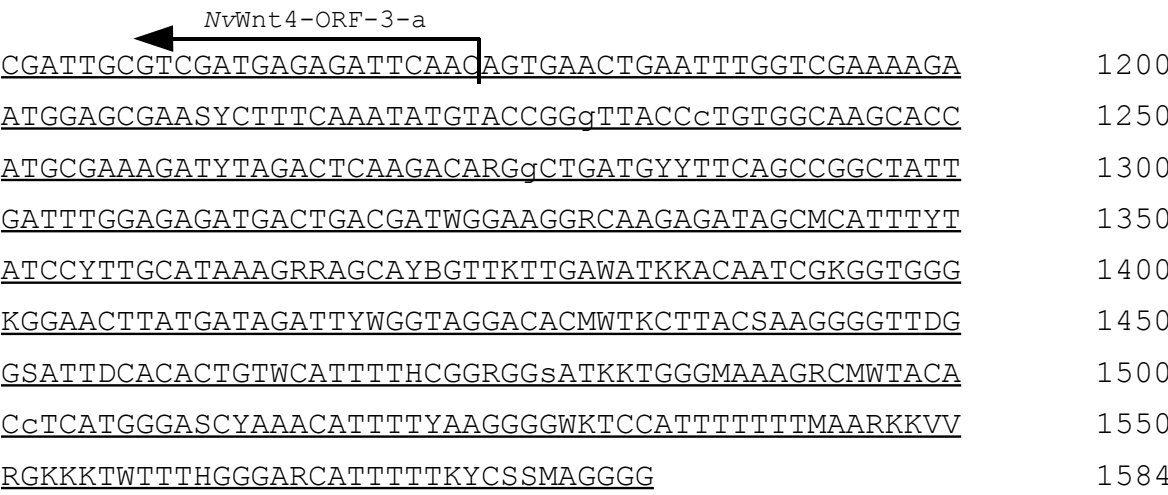
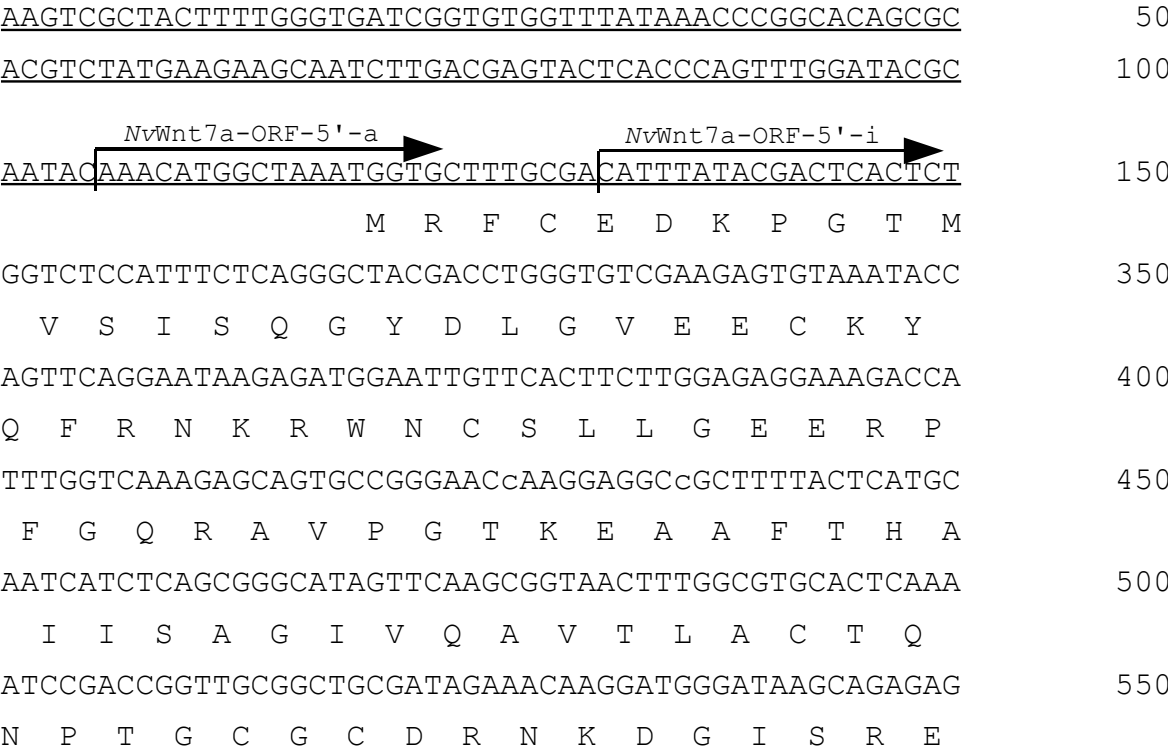


Abb.13: Übersicht über die Transkriptsequenz von NvWnt4.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer. Der mit degenerierten Primern identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen. Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

NvWnt7a:



NvWnt7a-3'-RACE-a	
GGGTGGAAATGGGGAGGCTGCAGCGTCAATATTGGCCACGGCTTGGCGGT	600
G W K W G G C S V N I G H G L A V	
NvWnt7a-3'-RACE-i	
GGCCAAGGAGTTCTTAAATGCGAACGACGGGGTTCAGGAGCGATATAGCCC	650
A K E F L N A N D A V R S D I A	
NvWnt7a-5'-RACE-i	
TGATGAATCGCCACAACAACGAAGTCGGCAGAGAGGTAGTCAACCGCAGC	700
L M N R H N N E V G R E V V N R S	
NvWnt7a-5'-RACE-a	
CTGTTAACAGAGTGTACATGCCACGGTCCATCTGCTTCGTGCGTCACGCG	750
L L T E C T C H G P S A S C V T R	
CACATGCTCACAAGCCCTCCCTTCGCCCCGTGCTGTTAGTAATAGGCTAA	800
T C S Q A L P S P R A V S N R L	
AGGCTCTTTACGACACAGCAAGGCGCGCAACTGTCTACCTATCATCTCTG	850
K A L Y D T A R R A T V Y L S S L	
GTGCGACCGGACGACAAAGTAGAAAAAGTCAAACCAATGGATCTCGCATA	900
V R P D D K V E K V K P M D L A Y	
CCTTAAGGATTCGCCTAACTACTGCACGAAGAACACCCTCAGCAAGCTTC	950
L K D S P N Y C T K N T L S K L	
CAGGGACGCTTGGAGGGAATTGTAAGATTTCCGACGATAGCCAAGAAGAG	1000
P G T L G G N C K I S D D S Q E E	
GAAACTGTGACGTCATGTGTTGTGGACGTGGCTACGACACTCACCTGAT	1050
E N C D V M C C G R G Y D T H L I	
CACCAAGAGGTGGCAGTGCAGGTGCAAGTTTGTGTGGTGCTGTAATGTCA	1100
T K R W Q C R C K F V W C C N V	
NvWnt7a-ORF-5'-i	
GATGCAGCACGTGCTCTAAACGTGACATTGTCCAGACGTGCAAA TAGCAT	1150
R C S T C S K R D I V Q T C K *	
CGGCACGATCACGTGCCCTAAGCGTGATACTGTGCGGCAGGTATTCAAAT	1200
TAGCTTCAGCACGATCACGCGCTCAAAACGTGACATTTT TAGGCGTACAA	1250
ATAGTTT TTAACACCATCATGTCCTCCAAGCGTGAAACTGTACAAATATTC	1300
AAATTAGCTTCATCACAATCACGTGCTCCAAGCGTGACATTTTCTAGGCG	1350
CGCAAATAGTATTAACACAATCATGTGCTCCTAGCGTGATACCGTCAGAC	1400
GTGCAAATAGCATCAGCACGATCACGTGCTCCAAGCGTGGCAGTGTCCAC	1450

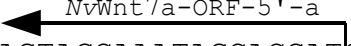
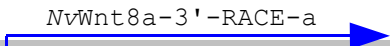
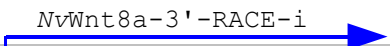
	
<u>CTTTGCAAATAGCTTTGCAAGTAGCAAATAGCACGATCGATCATCCAAGT</u>	1500
<u>TTCCCTATTGCATTTGTTAATATAGGGATTTCTTAAAACTATAAGAGAA</u>	1550
<u>AGGTTTGCCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	1581

Abb.14: Übersicht über die Transkriptsequenz von NvWnt7a.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer. Der mit degenerierten Primer identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen. Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

## NvWnt8a:

<u>TAGGGACACGCTCGAAAAATATAACATATTTTTCTTTAAGTGTTAATGTG</u>	50
<u>TGTTATCTAAATGCATATATAA</u> <b>TTG</b> <u>GATTGTTTTCTTGCATTCACAGCTA</u>	100
L D C F L A F T A	
<u>ACAGAGAGACAGCCTTCGTACACAGTATAAATACCGCAGCCGTCACGTAT</u>	150
N R E T A F V H S I N T A A V T Y	
<u>TTCTTAACCAGGGACTGTAGGAGAGGCATCTTTAGGAATTGCGCGTGTGT</u>	200
F L T R D C R R G I F R N C A C V	
<u>GCGACAGACGGGCCAAGCTGGAGAATGGCGGGGGTGCAACGACAATGTCA</u>	250
R Q T G Q A G E W R G C N D N V	
	
<u>AGTTTGGTGAAGTGCTTT</u> <u>CCAAACACTTCCTAAACGCCCGCCATGTGGAC</u>	300
K F G E V L S K H F L N A R H V D	
<u>AAGCGCAAGGCCAGAGCGGTCATCCATTTGCACAACAACGCTGTTGGGCG</u>	350
K R K A R A V I H L H N N A V G R	
<u>CAAAGCTGTTAAGAAGACTTTAAAGCAACAGTGCAAGTGCCACGGCGTGT</u>	400
K A V K K T L K Q Q C K C H G V	
<u>CCGGCGGATGTTTCGAGCAAAAGCTGCTGGAAAACATTGCCACTGTTTTCC</u>	450
S G G C S S K S C W K T L P L F S	
<u>GAAATAGGAGACTACCTTAAAGCAAAGTACCAACAAGCTCAAAAAGTCCG</u>	500
E I G D Y L K A K Y Q Q A Q K V R	
	
<u>TCTGCATACCAACAAGCTTGTGTTTGA</u> <u>AACTTCCTTCCCGTGTGTTTGCAC</u>	550
L H T N K L V L K L P S R V F A	

```

CGCTGACCAAAAAAGCCCGTCGCAGCCTGGTCTTCCTAAAACCCCTCTCCA      600
P L T K K A R R S L V F L K P S P
GACTACTGTCACCGCGACACAAAGAAAGGGTCAACCGGTGTGCTAGGTCG      650
D Y C H R D T K K G S T G V L G R
AGAATGTAGCAGCGATAGCCCAAATTACTTGGAGTGCATTCAGATGTGTA      700
E C S S D S P N Y L E C I Q M C
CGTCTTGTGATTATCGAGTGGAGAAAAAGTTAGCCGTCAGAAGTAGCAAA      750
T S C D Y R V E K K L A V R S S K
TGTAAGTGTAAAGTTTGTCTGGTGTGTTGTGACATCAAGTGTAGCGAGTGCA      800
C N C K F V W C C D I K C S E C
AGAAATTGGTTGCTGTTACGAAATGTGTGCGCTAA      834
K K L V A V T K C V R *

```

Abb.15: Übersicht über die Transkriptsequenz von *NvWnt8a*.

Putativer 5'-untranslatierter Bereich ist unterstrichen. Das Stopkodon ist gelb hinterlegt und unterstrichen. Die putative 5'-UTR ist Grün hinterlegt. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer. Der Bereich aus der EST-Bank ist grau hinterlegt und unterstrichen.

#### *NvWnt10*:

```

ACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTGGACACTGACATGG      50
                                     NvWnt10-ORF-5'-a
ACTGAAGGAGTAGAAAGAGTGCCAGCTATGGCAAAGTGTAAGACGCTTCA      100
                                     NvWnt10-ORF-5'-i
AGTTATGTGAAGATCCACTACAGATGAGCGCGCTAGCTCAAGCCAGGACG      150
                                     NvWnt10-ORF-5'-i
TGAACAATTCAAGGTGACGACCGCGCGATAGCGAGTTTCCTACGACATGG      200
                                     M
ATTTTCAGAGGATTTGTGAAAGTCCTACTTATCTTCTTTTCAGATCCACTCC      250
D F R G F V K V L L I F F Q I H S
AAGGGATTTCGGCTACGGGATACTCAAGACTAGTATACcATTCTGAAGACCC      300
K G F G Y G I L K T S I P F E D P
GGTTATCAACTCCAACACAGTATGCAAAAACACGCCATCACTGAGCAAAG      350
V I N S N T V C K N T P S L S K

```

AGCAGCTGAAGATGTGCAGGCGACTCCCAGATGTAGTAGCTAGCGCACTA 400  
E Q L K M C R R L P D V V A S A L  
CAAGGCATGCAGTATGCCATTCACGAGTGCCTGGCGCAGTTTCGCTACCG 450  
Q G M Q Y A I H E C L A Q F R Y R  
ACGGTGGAACTGCTCTTCTTTGGAAATGAAAAACAGAAACCCTCTGGCAA 500  
R W N C S S L E M K N R N P L A  
ACCCTTTGCTCTCTCGCGGGTTCCGTGAGACAGCGTTTCGTGCACGCTATC 550  
N P L L S R G F R E T A F V H A I  
CTCTCCGCGGGAATGACCAGCTCCGTGGCGCGAGCCTGCAGTATGGGCAA 600  
L S A G M T S S V A R A C S M G K

NvWnt10-3'-RACE-a

GCTCGCCAAATGCGGTTGCGACGAGTCCCTGAGGGGAGAGGGACGGGC 650  
L A K C G C D E S L R G R G T G  
GGGAGTGGGGTGGCTGTGGCGATAATATTGACTACGGCATTGAAACGTCT 700  
W E W G G C G D N I D Y G I E T S

NvWnt10-3'-RACE-i

NvWnt10-5'-RACE-i

NvWnt10-5'-RACE-a

GCCAAATTTTGGACTCGCGCGAGAAAGGACGAGATTTACACTCCATGAT 750  
A K F L D S R E K G R D L H S M M  
GAACATGCACAATAACATGGTCCGAAGAACGACCTTGAGTGAAAACGCTA 800  
N M H N N M V G R T T L S E N A  
AAACAAAATGCAAGTGTACGGGATGTGCGGATCGTGCAGCGTAAAAACG 850  
K T K C K C H G M C G S C S V K T  
TGCTGGAAGACTGTGCCCCGACATCCGGGAGATTGGCGACCGTTTGATGGA 900  
C W K T V P D I R E I G D R L M E  
AAAGTATGATCACGCGACTACTATAGGGATGGGGAACGGACGGCTTCGAC 950  
K Y D H A T T I G M G N G R L R  
TTCATTTGACGCGCCGCAAAGCACGTCGGTCCAGTGTGGGTAGGGCGCTT 1000  
L H L T R R K A R R S S V G R A L  
GTCTACTACGAGGATTCCCCAAATTACTGCATTGAGAATAAGGAACTGGG 1050  
V Y Y E D S P N Y C I E N K E L G  
ACAATTGCCAAAATCTGTGCTGCGAGCGGGGTACACCACTAAGAAGCTG 1100  
I F G T R G R I C S P E S L D T  
GATTTTCGGTACACGTGGCAGGATTTGTTACCGGAATCCTTGGACACGG 1150  
D N C Q N L C C E R G Y T T K K L



CAAGTAACCAAACGATGTCGCTGTCACTTCAGCTGGTGTGCTATTTGAT	1200
Q V T K R C R C H F S W C C Y L I	
TTGCGACACTTGCAGAGAGACTTCCACTGTTAGTATCTGCAGT <u>TAAGCTG</u>	1250
C D T C R E T S T V S I C S *	
<div style="text-align: right;">← <i>NvWnt10-ORF-3'-i</i></div>	
<u>CCAACCCAAAGCGGAAAAGAAGTGTATCTACTGGCTGGGGTGGCACTAC</u>	1300
<u>ATCAAGATGTAAACGCGCCTATGAAGGGAATAAACGCATCGCATGCAATA</u>	1350
<u>GCATAAGTAATAGGTTGAGTGTAAAAGATGCGAGAGACATTCTTTTTT</u>	1400
<u>AAATTGACGTTGGTATCGAAAGTTTTTGTGCGTTATCTCAAACAGCAA</u>	1450
<u>ACACAACATACGTGTGCGCAAGGCTTGAGTGTATTCAGTTAACGTGGCCG</u>	1500
<u>TTACAGAGCGATACGCAAGATTTTGATGGTCTATTTGACAGATTATTGAT</u>	1550
<div style="text-align: center;">← <i>NvWnt10-3'-RACE-a</i></div>	
<u>CGCAAAATAAATTTGGTTTGCTCCTGACACTGCTTGTTTATAATGCGTGTA</u>	1600
<u>AATGACTGATGTGTTATCAAAGGAACATAAAAACAGAGTCACTCTGAAAA</u>	1650
<u>AAAAAAAAAAAAA</u>	1663

Abb.16: Übersicht über die Transkriptsequenz von *NvWnt10*.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer. Der mit degenerierten Primer identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen. Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

***NvWnt11*:**

<u>GAAAGTGTATACCTTCTGCGATTAATTATACTTCTCTTGTGTTGTAGGTGC</u>	50
<div style="text-align: right;"><i>NvWnt11-ORF-5'-a</i> →</div>	
<u>GTGGAGATTCAAAGATCTGTATTAAGTAGCACGATCAGTAAAGCAGGGAG</u>	100
<div style="text-align: center;"><i>NvWnt11-ORF-5'-i</i> →</div>	
<u>CTGATAGTAGGATCGGTGACTCAAGATG</u> TACTCTTTGTTTGGCCTTTTTTG	150
M Y S L F G L F	
TGGTCCTTTGCCTGTCCATTTTGGAGTCCGGTAGTGACAATCAGATGGCT	200
V V L C L S I L E S G S D N Q M A	
GGGGATTGACATACATCGCAACACACGTGGGACAAAAGACTGCAACAG	250
G D S T Y I A T H V G Q K D C N R	

GATCCATGGATTTCAGTGGTAAACAGTACAAAATATGTCGGCGGAATCTTCTTC	300
I H G F S G K Q Y K I C R R N L	
CAGCCATGCCCTATGTGACAGCAGCGGTCGAGATGACCCCGAAAGAGTGC	350
P A M P Y V T A A V E M T P K E C	
CAACATCAGTTCCAAAATAAAAGATGGAATTGCTCTACTATCATGAAAGC	400
Q H Q F Q N K R W N C S T I M K A	
CCCACAGTTTTTTACCGGATCTGAAGCGAGGTACCCAGAGGCTGCGTTTG	450
P Q F L P D L K R G T P E A A F	
TGTACGCTCTGTCAGCCGCTGCCCTCACCTATTCCATAACGCAGGCGTGC	500
V Y A L S A A A L T Y S I T Q A C	
GGCATGAAGCGCCTCAAGCCCTGCAAGTGTGGCACCAACCCCAAGTTCAA	550
G M K R L K P C K C G T N P K F K	
GCACCCCGATGGCGAATGGGGCGGTTGCCATGACAACATAGCTCGGGGCA	600
H P D G E W G G C H D N I A R G	
<div><div>NvWnt11-3'-RACE-a</div><div>NvWnt11-3'-RACE-i</div><div>NvWnt11-5'-RACE-i</div></div>	
TGCCTTTAGCAAAGACTTCACGGACGCGGTGGAAGCTCAGCGCATGAAA	650
M R F S K D F T D A V E A Q R M K	
CACAAATCGATGGCCGTGGCTCTGATGAACCTGCACAACAATGGCGTCCGG	700
H K S M A V A L M N L H N N G V G	
CAGGAAGGCCGTGCACTCCCGTCTTGAGTTCCACTGCAGGTGTCATGGCG	750
R K A V H S R L E F H C R C H G	
TTTCCGGTGGCTGCACCGCCAAGACCTGCATCCGGCGCCTGGGCGACTTC	800
V S G G C T A K T C I R R L G D F	
CGCCTGGTGGCGGACCTCCTCAAGAAGCGCTACGCGCGAATTGTGTACGT	850
R L V A D L L K K R Y A R I V Y V	
AGAAAGCAAACGAAATCCAAGCGCAAAGCGCGCTCTTGAAATCCAAGC	900
E S K T K S K R K A R V L K S K	
GCGGACGGCGTCGTTATACATCAAGTGACCTGGTGGCGCTCCAAGGGTCG	950
R G R R R Y T S S D L V A L Q G S	
CCTAACTACTGCCACAAAAACAGAAAGCGTGGAACGGCGGGGACGCACGG	1000
P N Y C H K N R K R G T A G T H G	

NvWnt11-ORF-3'-i

AAGGCTGTGTGACCCGACTAAGAGAAGAGGAGAAGGGAGCTGTGCGTATC 1050  
 R L C D P T K R R G E G S C A Y  
TTTGTTGCGGGCGAGGACACAGGACTGTGGAGGTGGTACATGAGGAGAGA 1100  
 L C C G R G H R T V E V V H E E R  
 TGCGAGTGCAAGTACATATGGTGTGCTACGTCAAGTGTCAAACCTGCCG 1150  
 C E C K Y I W C C Y V K C Q T C R  
 GAAACGGGTACGAGAAAGTCGATGTTTG TGAACATGCGCAATTTAAGAAA 1200  
 K R V R E S R C L \*

NvWnt11-ORF-3'-a

GAACTTAAAGGTCAGATTACTTACGTCAAATCACTAGTGCGGCCGCCTGCA 1250  
GGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAAGCGCGTGAT 1285

Abb.17: Übersicht über die Transkriptsequenz von NvWnt11.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer, der mit degenerierten Primer identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen, Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

## NvWntA:

NvWntA-ORF-5'-a

GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAA GAGATGGCTGTCTCCGTTG 50  
 M A V S V

NvWntA-ORF-5'-i

▶ CAGTCATAACCTTAGCGATACTCCTCTCTGAACAAGCAGACGGACGAAGG 100  
 A V I T L A I L L S E Q A D G R R  
 AAATTCAGGGACAACCCAGTGATCCCGTCTGCTCGACCGAGTTTAGTCAC 150  
 K F R D N P V I P S A R P S L V T  
 CAGCGAAGAAGTCACTCAGTTCTGCTCTCTCATGCCATGGATGAAACCTC 200  
 S E E V T Q F C S L M P W M K P  
 ATCAAAAGCAAAAATGTCTGCTTGAGCCACTAGTCATGCCTAGCGTTCAG 250  
 H Q K Q K C L L E P L V M P S V Q  
 CGCGGGGTTGGGATGGCCCTTGAAGAGTGTCTAGCCATTATAGCGATCA 300  
 R G V G M A L E E C P S H Y S D H  
 CAAGTGGAATTGCTCCGGGGTAAACACAGCACAGGTCTTTCAGGAGCGGG 350  
 K W N C S G V N T A Q V F Q E R

GAATCTTAAAAACAAATACCAAGGAGAGCGCCTTCGTGTTTGCTCTCACA	400
G I L K T N T K E S A F V F A L T	
TCAGCAGGGGTGTCCTTTCAAATAACCAAGGGCTGTAGCCTTGGCAACTG	450
S A G V S F Q I T K G C S L G N W	
GGAACAGTGCGGTTGTGATACGCAGGTTTCGCGGGCGCGTGCAGACTAAAG	500
E Q C G C D T Q V R G R V Q T K	
ACGAGGCGAGT	
<div> <div>NvWntA-3'RACE-a</div> <div></div> </div>	
<u>TGGGAATGGGGCGGATGCAGCGAAAACGTGGGGCATGGG</u>	550
D E A S W E W G G C S E N V G H G	
<div> <div>NvWntA-5'RACE-i</div> <div>NvWntA-3'-RACE-i</div> <div>NvWntA-5'-RACE-a</div> </div>	
<u>GACGATTTCTCACGCAAATTCA</u>	600
D D F S R K F M D P E P P R K E L	
<u>GGAATACCTGTTGGTGAAGCATAACAACGAGGCTGGG</u>	650
E Y L L V K H N N E A G R K A L	
AGGATAACATGGGCAAGACATGTAAATGCCACGGCGTGTCTGGGGTCTGTC	700
K D N M G K T C K C H G V S G S C	
ACTGTGAAAATATGCTGGCGTACTATGCCAACTTCAGCGTCGTGCCCCA	750
T V K I C W R T M P N F S V V P Q	
ATTACTACGCAAGAAATTCGACCAAACAATAAGGTCAAAGCTAACGACA	800
L L R K K F D Q A T K V K A N D	
AAAAGACGAAACTCCAACGTATCACTCGTGGTAAGCGGGGTAAGAAGAAG	850
K K T K L Q R I T R G K R G K K K	
AGGCAGAAGGGCAGACGACCATCTGCGGGGGATCTGGTCTTCGCGGAAAA	900
R Q K G R R P S A G D L V F A E K	
ATCCCCGAAATTTTGCATCCCAAATCCGGAGTTAGGAATTCTTGAACAA	950
S P K F C I P N P E L G I L G T	
GAGGTCGTGTGTGTGATGCAAATGCCAAAGATAATCGAGGGTGCAAAAAG	1000
R G R V C D A N A K D N R G C K K	
ATGTGCTGTAATCGCGGGTACGACACATTCAAGTTGTGCAATCAAGTCAA	1050
M C C N R G Y D T F K L S N Q V K	
GTGCAACTGCGAATTTATTTGGTGTGCAAGGTGCAGTGTGACATGTGTA	1100
C N C E F I W C C K V Q C D M C	
<div> <div>NvWntA-ORF-3'-i</div> <div></div> </div>	
AAAAGGACTGGACCGAGTATCGATGCCGAT	1150
K K D W T E Y R C R *	

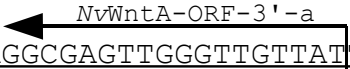
<u>AACATAAATGCCTTGGGAAGGAGTTCGCGTATTAAAATAACGCCTTTACTT</u>	1200
<u>CGGCAAGATTGAACACTTGTGTATTGAACACAAGTCAAACAAAAGGTTGA</u>	1250
<u>AATCTCGGCATGGATTCTCCACGAAAACCTCCTCCTGATCACGTGCCTTG</u>	1300
<u>GCATTCTGATCACGTGTGTTTTGGTCCGATGTTCTTATGCAGTGGCCCCCT</u>	1350
<u>ACGTGTTATATCACTTTTATCACGTGTCTTAGTATTCTGATCACGTGATA</u>	1400
<u>GTAGCATGGACACCGTATAGTGATTATTTGATGCTTATTGACATCATTCA</u>	1450
	
<u>AGGCGAGTTGGGTTGTTATTTTCCGAGGGTTAATGCTCTTATAGCGGCG</u>	1500
<u>TACTTGAAATCTGAAATTTAGCTGAATATCTGTCAAAAAAAAAAAAAAA</u>	1550

Abb.18: Übersicht über die Transkriptsequenz von NvWntA.

5'-und 3'-untranslatierte Bereiche sind unterstrichen. Blaue Pfeile markieren die 3'-RACE-Primer, rote Pfeile die 3'-RACE-Primer, schwarze Pfeile die 5'- und 3'-ORF-Primer. Der mit degenerierten Primer identifizierte Bereich ist grau hinterlegt und unterstrichen. Start und Stop Kodone sind gelb hinterlegt.

### 3.3 Alignierung von putativen Wnt Aminosäuresequenzen

Für die Errechnung molekularer Stammbäume aus Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen müssen die verwendeten Sequenzen zuerst aligniert werden. Das Computerprogramm ClustalW, das für die Alignierung von Aminosäuresequenzen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, erzeugt ein biologisch relevantes Alignment aus verschiedenen Sequenzen. Es errechnet die größten Gemeinsamkeiten für die verwendeten Sequenzen und aligniert sie so, daß identische, ähnliche (semikonservative) und unterschiedliche Positionen übereinander angeordnet werden. Außer den in 3.2 aufgeführten Aminosäuresequenzen wurden aus *N. vectensis* weitere Mitglieder der Wnt-Genfamilie (NvWnt2, NvWnt5, NvWnt6, NvWnt7b und NvWnt8b) im Labor von Marc Q. Martindale identifiziert. Diese Sequenzen wurden mit in die Alignierung und die anschließenden Stammbaumberechnungen eingeschlossen. Zunächst wurden, die aus den cDNA Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen sowie eine Auswahl von Transkriptsequenzen aus Vertretern der großen übergeordneten taxonomischen Phyla Deuterostomia, Ecdysozoa, Lophotrochozoa und Cnidaria, durch ClustalW nach gemeinsamen konservierten Motiven geordnet (Ag = *Anopheles gambia*, Bf = *Branchiostoma floridae*, Bm =

*Bombyx moori*, *Ce* = *Coenorhabditis elegans*, *Dm* = *Drosophila melanogaster*, *Hs* = *homo sapiens*, *Hv* = *Hydra vulgaris*, *Nv* = *N. vectensis*, *Pd* = *Platynereis dumerilii*, *Pv* = *Patella vulgata*) (eine vollständige Auflistung der verwendeten Sequenzen befindet sich auf Seite 100, Material und Methoden 5.5). Der N-terminale Bereich der translatierten Aminosäuresequenzen, vom Start-Methionin bis eine Aminosäureposition vor dem ersten konservierten Cysteinrest, wurde aus allen Sequenzen entfernt. Dieser Bereich kodiert für das Signalpeptid, das die Sekretion in das richtige Zellkompartiment steuert. Die Signalpeptide der Wnt-Aminosäuresequenzen unterscheiden sich selbst innerhalb der einzelnen Wnt-Subfamilien so stark in ihrer Sequenz und Länge, daß sie nicht zur Berechnung molekularer Stammbäume beitragen, sie aber stören können. Das durch ClustalW erzeugte Alignment wurde per Hand editiert. Die Qualität des Alignments in Bezug auf die biologische Relevanz, ist von fundamentaler Bedeutung für die Qualität der daraus berechneten molekularen Stammbäume. Daher wurde das Alignment nicht nur nach dem Konservierungsgrad einer Aminosäureposition über alle Sequenzen editiert, sondern ebenfalls nach anderen Eigenschaften, der an der entsprechenden Stelle stehenden Aminosäure. So hat das Vorhandensein oder Fehlen eines der konservierten Cysteinreste eine größere Bedeutung für die Funktion des Liganden als bei anderen Positionen. Das Alignment befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

### 3.4 Berechnung der Verwandtschaftsverhältnisse von Wnt Aminosäuresequenzen verschiedener Metazoen

Ausgehend von dem handeditierten Alignment der oben genannten Wnt-Aminosäuresequenzen und weiteren Sequenzen aus Datenbanken (NCBI, Sanger) sowie von Marc Q. Martindale (Hawaii) (Kusserow et al., 2005). wurden phylogenetische Berechnungen durchgeführt. Die 12 in *N. vectensis*, sowie die in *Hydra vulgaris* identifizierten Wnt-Aminosäuresequenzen sollten wenn möglich, den aus anderen Organismen bekannten Subfamilien zugeordnet werden. So sollten Rückschlüsse auf die Wnt-Gen-Ausstattung des letzten gemeinsamen Vorfahren der Cnidaria und Bilateria ermöglicht werden. Für die Berechnung der molekularen Stammbäume wurden drei verschiedene Algorithmen verwendet. Maximum-parsimony-Analysen wurden mit dem Programm PAUP

(<http://paup.csit.fsu.edu/>), Maximum-likelihood-Analysen mit TreePuzzle ([www.tree-puzzle.de](http://www.tree-puzzle.de)) und Bayesian-inference-Berechnungen mit MrBayes durchgeführt (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes>).

Alle drei Methoden erzeugen Stammbäume mit den 12 Wnt-Subfamilien Wnt1-11 sowie WntA mit guter statistischer Unterstützung. In Cnidariern (*N. vectensis* und *Hydra vulgaris*) sind Orthologe von 11 der 12 Subfamilien vertreten, lediglich ein Vertreter der Wnt9-Subfamilie konnte nicht identifiziert werden. Hierbei bleibt unklar, ob ein Mitglied dieser Subgruppe in Cnidaria fehlt, oder unter den bisher gewählten Bedingungen nicht identifiziert werden konnte. Den Subfamilien Wnt7 und Wnt8 konnten jeweils zwei *NvWnt*-Paraloge zugeordnet werden. In beiden Fällen sind die Paraloge näher miteinander verwandt als mit einem der beiden Paraloge des Menschen. Vermutlich handelt es sich um Cnidaria- oder Anthozoa-spezifische Duplikationen. Als Außengruppe wurde in allen molekularen Stammbaumberechnungen *HsWnt16* verwendet. Mitglieder dieser Subfamilie konnten bislang nur in Vertebraten identifiziert werden. Daher ist in dieser Subfamilie außer der menschlichen Sequenz kein weiterer Vertreter in den berechneten Stammbäumen enthalten. Dies macht diese Sequenz als Außengruppe besonders geeignet. In den TreePuzzle- und MrBayes-Berechnungen wurde das Substitutionsmodell von Jones, Taylor und Thornton (Jones et al., 1992) verwendet.

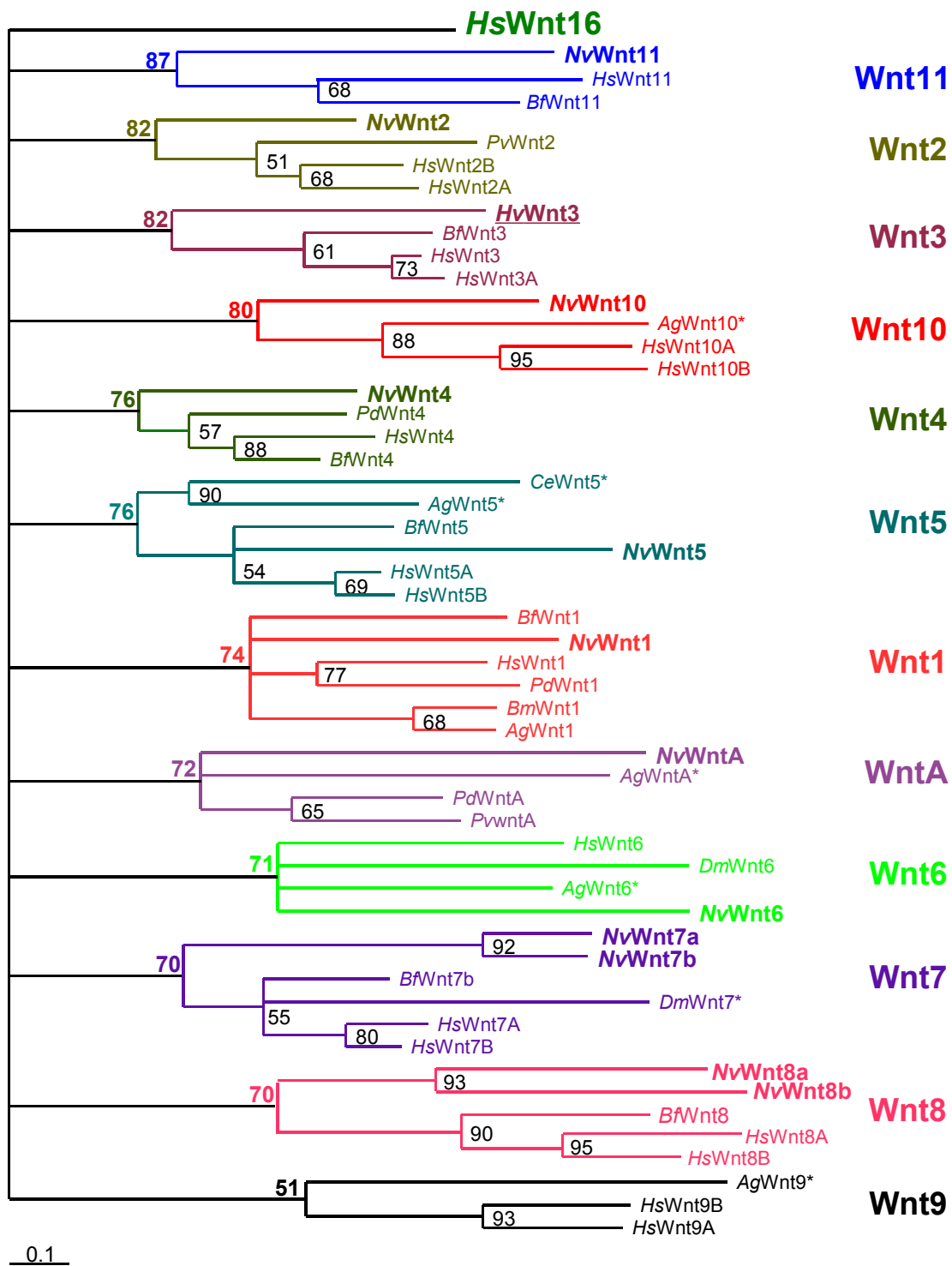
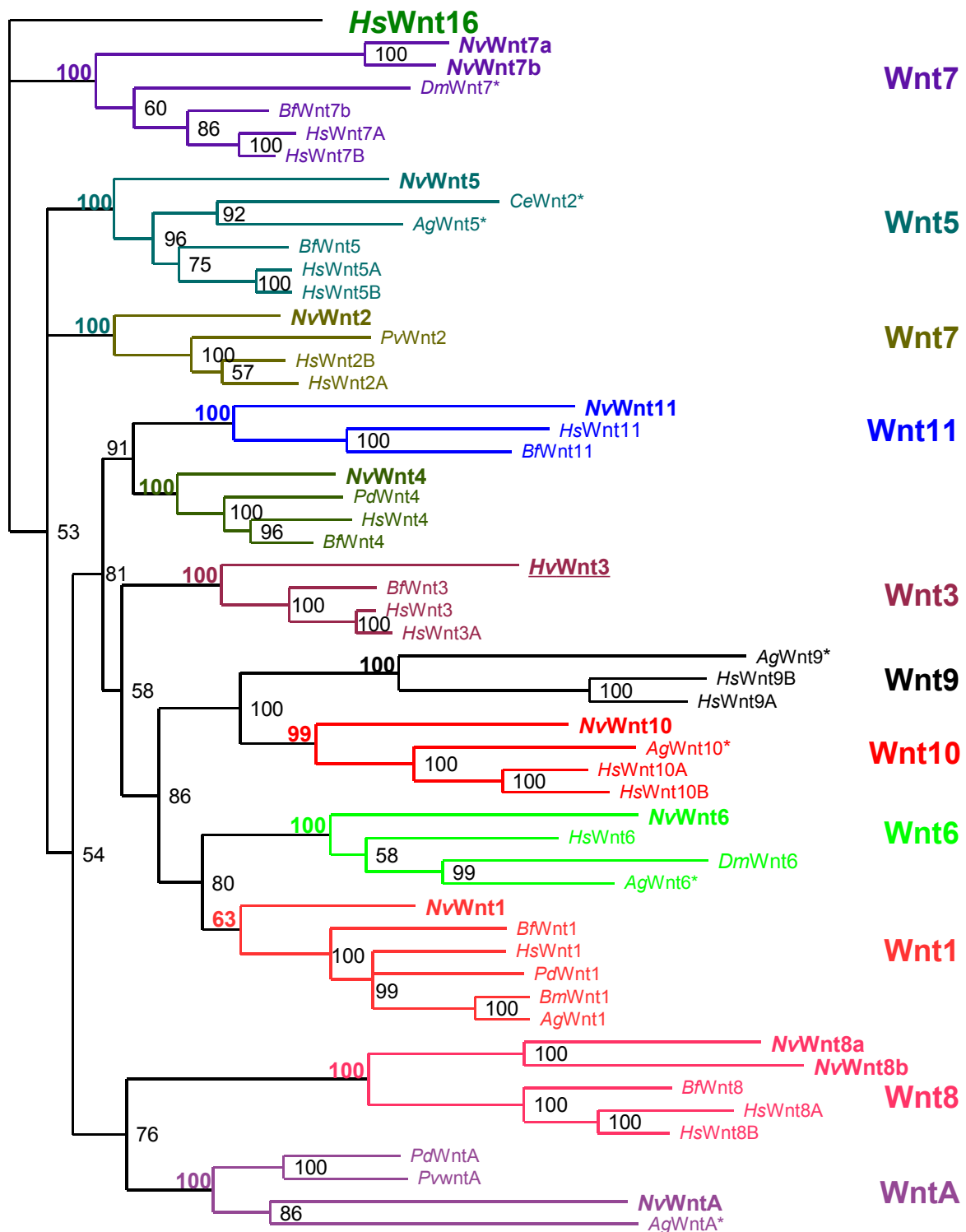


Abb.19: Mit TreePuzzle (maximum likelihood) errechneter molekularer Stammbaum der Wnt-Liganden.

12 Subfamilien an Wnt-Liganden können unterschieden werden. Hinter jeder Subfamilie steht ihr Name. Über dem Zweig der zu jeder Subgruppe führt, ist ihre statistische Unterstützung farbig angegeben. *N. vectensis* Sequenzen sind größer und fett dargestellt. Die *Hydra vulgaris* Sequenz ist größer, fett und unterstrichen. mit \* sind die Sequenzen versehen, deren Bezeichnung für eine bessere Übersichtlichkeit geändert wurden. Speziesabkürzungen sind kursiv (siehe S. 101 Punkt 5.6). Außengruppe ist *HsWnt16*. Maßstab markiert die evolutionäre Distanz. Bild: Kusserow et al., 2005)

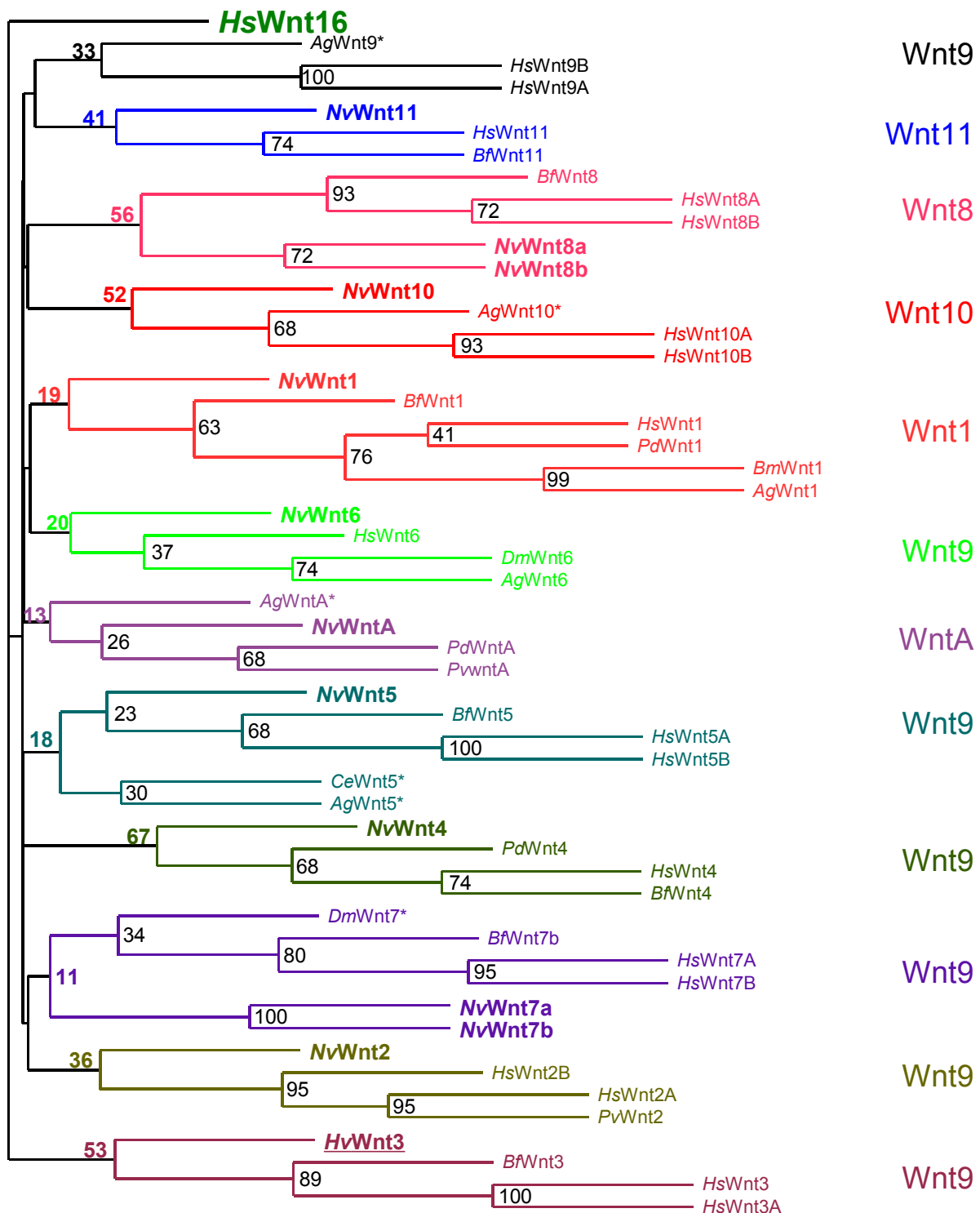




0.1

Abb.20: Mit MrBayes (Bayesian inference) errechneter molekularer Stammbaum der Wnt-Liganden.

12 Subfamilien an Wnt-Liganden können unterschieden werden. Hinter jeder Subfamilie steht ihr Name. Über dem Zweig der zu jeder Subgruppe führt, ist ihre statistische Unterstützung farbig angegeben. *N. vectensis* Sequenzen sind größer und fett dargestellt. Die *Hydra vulgaris* Sequenz ist größer, fett und unterstrichen. mit \* sind die Sequenzen versehen, deren Bezeichnung für eine bessere Übersichtlichkeit geändert wurden. Speziesabkürzungen sind kursiv (siehe S. 101 Punkt 5.6). Außengruppe ist *HsWnt16*. Maßstab markiert die evolutionäre Distanz. Bild: Kusserow et al., 2005.



10

Abb.21: Mit PAUP (Maximum Parsimony) errechneter molekularer Stammbaum der Wnt-Liganden. 12 Subfamilien an Wnt-Liganden können unterschieden werden. Hinter jeder Subfamilie steht ihr Name. Über dem Zweig der zu jeder Subgruppe führt, ist ihre statistische Unterstützung farbig angegeben. *N. vectensis* Sequenzen sind größer und fett dargestellt. Die *Hydra vulgaris* Sequenz ist größer, fett und unterstrichen. mit \* sind die Sequenzen versehen, deren Bezeichnung für eine bessere Übersichtlichkeit geändert wurden. Speziesabkürzungen sind kursiv (siehe S. 101 Punkt 5.6). Außengruppe ist *HsWnt16*. Maßstab markiert die evolutionäre Distanz. Bild: Kusserow et al., 2005.

### 3.5 Identifizierung Wnt-subfamilienspezifischer Aminosäuresequenzmerkmale

Da nicht immer vollständige Sequenzen eines Wnt Liganden zur Identifizierung der Subgruppenzugehörigkeit zur Verfügung stehen, wurden Wnt-Aminosäuresequenzen aligniert und nach subgruppenspezifischen Merkmalen untersucht. Die Aminosäurepositionen des jeweiligen Merkmals wurde auf die Position dieses Merkmals in einer Referenzsequenz bezogen. Die Referenzsequenz steht hinter der Positionsangabe in Klammern (*HsWnt16*, *HsWnt1* oder *HsWnt8a*). Allen Wnt1 Subgruppenmitgliedern fehlen die ersten beiden konservierten Cysteinreste in Position 43 und 56 (*HsWnt16*), diese Sequenzen enden an der Position 370 (*HsWnt1*). Die Mitglieder der Subgruppen Wnt8 und Wnt2 gehen über diese Position hinaus. Sequenzen der Subgruppe Wnt8 weisen zudem eine zwei-Aminosäureninsertion hinter Position 294 (*HsWnt8A*) auf. Diese Aminosäurepositionen fehlen in allen anderen Subgruppen (Im Alignment, Seite 42 d, Ergebnisse 3.3).

### 3.6 Analyse der räumlichen und zeitlichen Verteilung der *NvWnt*-Genexpression

Um Aufschluß über die mögliche Funktion der Wnt-Liganden in *N. vectensis* zu erlangen und mit dem der orthologen Transkripte anderer Organismen zu vergleichen, wurde das Transkriptionsmuster der Wnt-Transkripte während des Verlaufes der Entwicklung mit Hilfe von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden sichtbar gemacht. Alle Transkripte zeigen ein individuelles, keimblattspezifisches Expressionsmuster.

#### 3.6.1 Expression von *NvWnt1*

In der Entwicklung vom ersten Anzeichen der Gastrulation bis zum Erreichen des Primärpolypenstadiums, ist *NvWnt1* in einem engen zirkulären Muster im Ektoderm um den Blastoporus herum sichtbar. Sobald die ersten Zellen mit der Invagination beginnen, exprimieren die Zellen, die auf der Oberfläche der Gastrula verbleiben, das Transkript. Ektodermale Zellen, die während der Gastrulation in den Embryo gelangen und dort den Pharynx bilden, sind von der Färbung ausgenommen. Nur wenige Zellen, in einem Streifen mit einer Breite von wenigen Zelldurchmessern, weisen *NvWnt1* Expression auf.

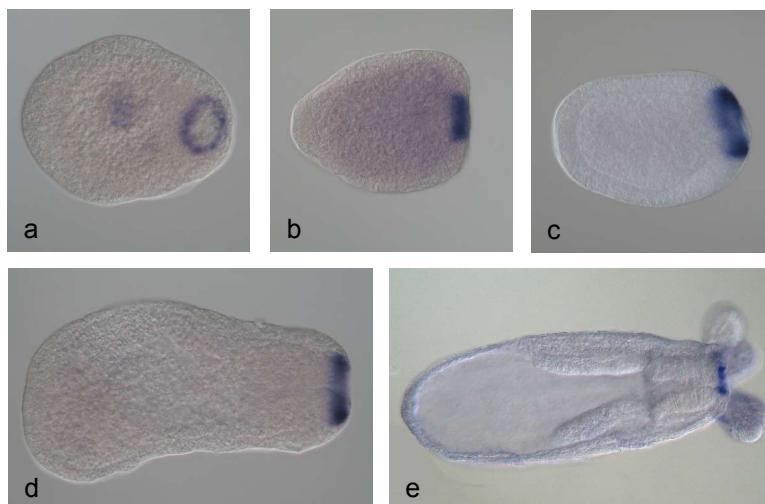


Abb.22: Übersicht über die *NvWnt1* Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien.

a) Die *NvWnt1* Expression beginnt mit der Gastrulation um den Urmund herum.

Dieses Muster bleibt in der frühen (b), mittleren (c) und späten (d) Planularlarve bis zum Erreichen des Primärpolypenstadiums (e) erhalten. (Blastoporus in allen Bildern rechts)

Bilder: (a,b,c,d) Kusserow et al., 2005.

### 3.6.2 Expression von *NvWnt4*

Die Expression von *NvWnt4* ähnelt der von *NvWnt1*. Auch die *NvWnt4* Expression beschränkt sich auf das Ektoderm. Jedoch ist die Expressionsdomäne deutlich größer und zieht sich weiter in Richtung aborales Körperende. Ein kleiner Sektor des Blastoporus zeigt keine Färbung. Ein solches asymmetrisches Expressionsmuster ist auch für ein Forkhead-Homolog aus *N. vectensis* beschrieben worden (Fritzenwanker, 2004). Möglicherweise reflektiert dieser Umstand den ungleichmäßigen Invaginationsvorgang. Die Expressionsdomäne liegt während der Metamorphose aborale von den sich entwickelnden Tentakel. Im Gegensatz dazu ist die *NvWnt1* Expression auf die orale Seite der Tentakel beschränkt. Zumindest einige Zellen, die durch die Gastrulation ins Innere des Tieres gelangen, exprimieren *NvWnt4*. Mit Abschluß der Metamorphose zum Primärpolypen endet die Expression dieses Transkriptes.

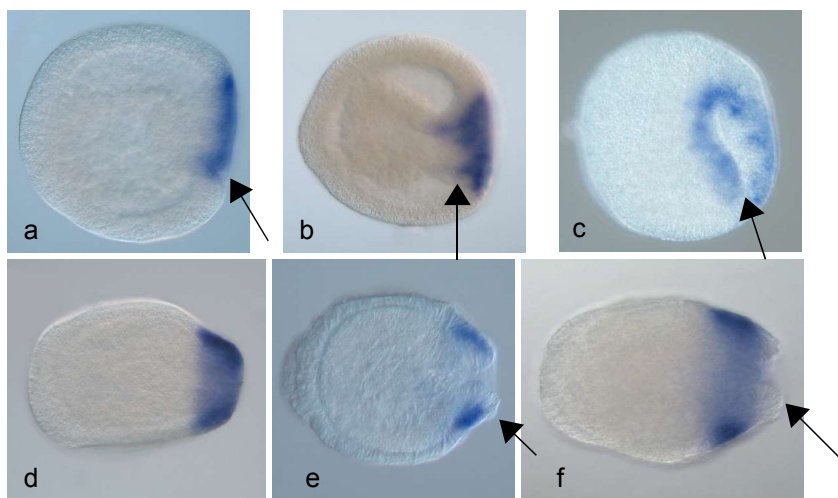


Abb.23: Übersicht über die Expression von *NvWnt4* in verschiedenen Entwicklungsstadien.

a) Sehr frühe Gastrula, wenige Zellen invaginieren, die Expressionsdomäne ist asymmetrisch in Bezug auf die Invaginationsstelle (Pfeil). b) Frühe Gastrula, das invaginierende Endoderm ist deutlich zu sehen, dem Ektoderm noch nicht von innen aufgelagert. Nahe am Blastoporus exprimieren auch einige invaginierende Zellen *NvWnt4* (Pfeil). c) Späte Gastrula oral / laterale Ansicht. Ein kleiner Bereich am Blastoporus zeigt keine Expression (Pfeil). d) Planularlarve, der gesamte orale Bereich zeigt *NvWnt4* Expression. e) Späte Planula, erste Anzeichen der Tentakelformation (Pfeil). Die Färbung liegt basal der entstehenden Tentakel. f) Beginn der Metamorphose. Entstehende Tentakel (Pfeil) schieben sich zwischen Blastoporus und *NvWnt4* Expressionsdomäne. Der Blastoporus liegt auf allen Bildern rechts.

Bilder: (b,c,d,f) Kusserow et al., 2005).

### 3.6.3 Expression von *NvWnt7a*

Die Expression von *NvWnt7a* ist erst nach dem Abschluß der Entwicklung zur Planulalarve, in einem bestimmter Subtyp von Nesselzellen detektierbar. Diese Zellen werden im Verlauf der Individualentwicklung erstmals in Planulalarven gebildet. Im Primärpolypen sind stark *NvWnt7a* exprimierende Zellen in den Tentakel zu finden. Etwas schwächer scheint die Expression in den Zellen gleichen Typs zu sein, welche im gesamten Ektoderm verteilt liegen.

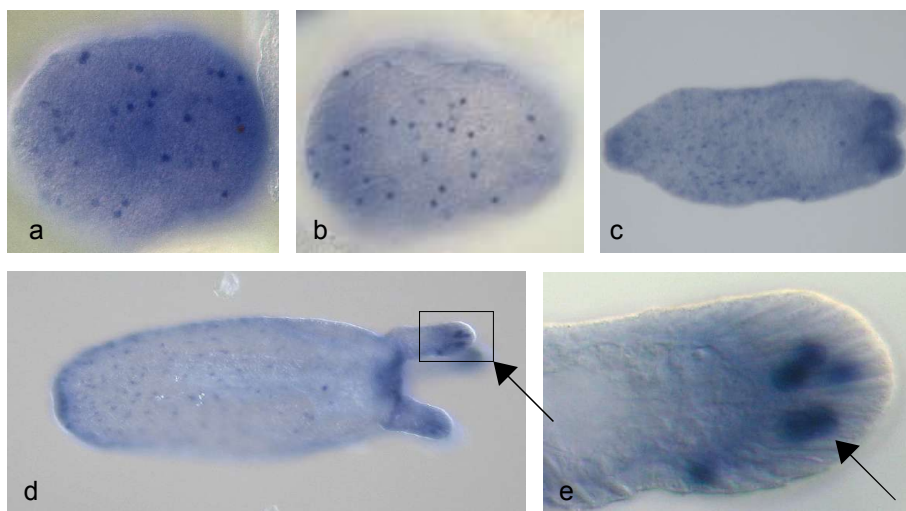


Abb.24: Übersicht über die *NvWnt7a* Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien

a) Lateralansicht einer frühen Planulalarve. *NvWnt7a* exprimierende Zellen sind im gesamten Ektoderm verteilt. b) Lateralansicht mittlere Planulalarve. c) Lateralansicht während der Metamorphose zum Primärpolypen. d) Primärpolyp mit starker *NvWnt7a* Expression in Nesselzellen der Tentakel. e) Vergrößerung eines Bildausschnittes (Pfeil) von (d) mit Nesselzellen (Pfeil) in den Tentakel.

### 3.6.4 Expression von *NvWnt10*

*NvWnt10* ist rein endodermal in den Mesenterien von Planularlarven und Primärpolypen sowie an deren Ansätzen an den Pharynx detektierbar. Schon die ersten Mesenterienanlagen exprimieren dieses Transkript. Die Mesenterienentwicklung beginnt in zwei einander im Embryo gegenüberliegenden Zellstreifen, die lichtmikroskopisch zunächst nicht von den sie umgebenden Zellen unterscheidbar sind. Kurz danach werden auch die restlichen sechs Mesenterienanlagen determiniert. Nur die beiden zuerst angelegten Mesenterien werden während der Entwicklung der Planularlarve vollständig entwickelt und sind zum Zeitpunkt der Metamorphose voll ausgebildet. Die später angelegten werden erst vollständig ausgebildet, nachdem sich das Tier zum Adultus entwickelt hat.

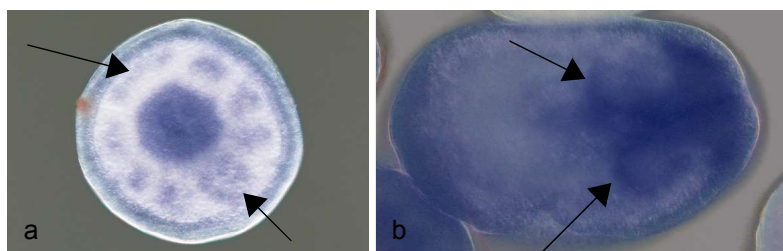


Abb.25: Übersicht über die *NvWnt10* Expression in Planularlarven.

a) Aufsicht auf eine mittlere Planularlarve. Die beiden weiter entwickelten Mesenterienanlagen (Pfeile) sind deutlich größer als die anderen. b) Lateralansicht einer späten Planularlarve. Die Mesenterienanlagen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

### 3.6.5 Expression von *NvWnt11*

*NvWnt11* ist das einzige der Wnt Gene in *N. vectensis*, das schon maternal exprimiert ist. In der RT-PCR (nicht gezeigt), mit für die *NvWnt*-Transkripte spezifischen Primern, konnte dieses Transkript als einziges aller bekannten Wnt-Gene aus cDNA aus unbefruchteten Eiern amplifiziert werden (Kusserow et al., 2005). Das Transkript wird nur in einer oder wenigen Zellen in frühen Teilungsstadien bis zur Blastula exprimiert. Mit dem Einsetzen der Gastrulation exprimieren nur noch wenige Zellen am Blastoporus schwach *NvWnt11*. In der späten Gastrula ist das Transkript nicht detektierbar. Mit dem Einsetzen der Nesselzellbildung wird das Transkript wieder exprimiert. Die späte Expression von



*NvWnt11* unterscheidet sich sehr stark von dem frühen Muster. Es entspricht dem der *NvWnt7a* Expression.

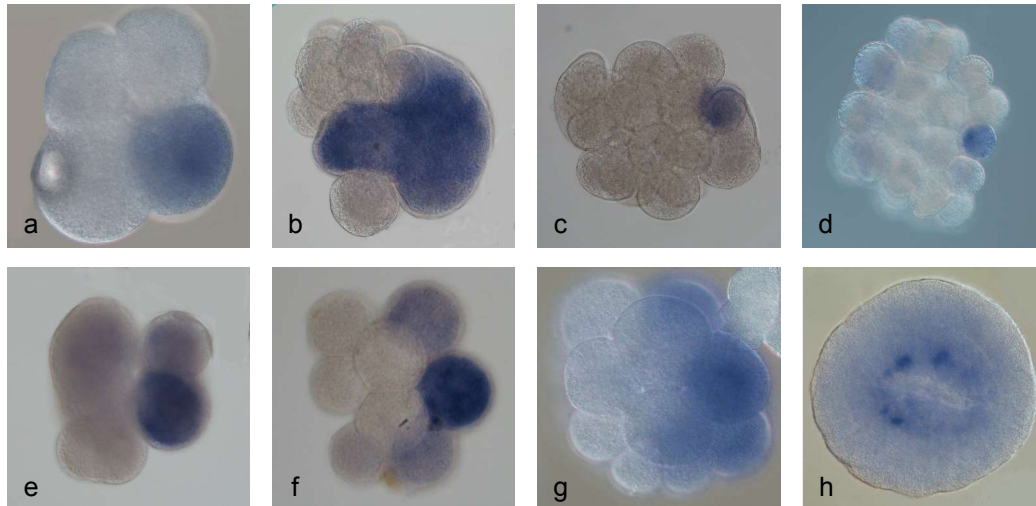


Abb.26: Übersicht über die frühe Expression von *NvWnt11* von den ersten Zellteilungen bis zum Beginn der Gastrulation.

a) Expression von *NvWnt11* in einem Blastomer nach der zweiten Zellteilung. b) nach der 4. Zellteilung. c) im frühen Morulastadium und d) in der frühen Blastula. e) Expression von *NvWnt11* in zwei Blastomeren im Verlauf der zweiten Zellteilung. Die Blastomere sind noch nicht vollständig voneinander getrennt. Die Expression im vorderen Blastomer ist deutlich stärker als im dahinter liegenden. f) Expression im 16-Zellstadium. Auch hier ist die Expression in einem der Blastomere besonders stark. g) Morula mit einigen *NvWnt11* exprimierenden Zellen. h) Aufsicht auf den Blastoporus einer frühen Gastrula, wenige Zellen am Blastoporus exprimieren das Transkript.

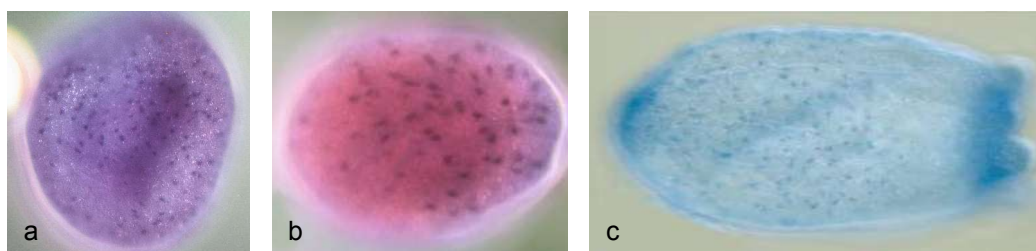


Abb.27: Übersicht über die späte *NvWnt11* Expression.

a) frühe Planularlarve. Der Blastoporus liegt auf der abgewandten Seite. *NvWnt11*-exprimierende Zellen liegen gleichmäßig verteilt im gesamten Ektoderm. b) Lateralansicht einer mittleren Planularlarve und c) eines frühen Primärpolyben. b,c) Blastoporus rechts.

Bilder: Kusserow et al., 2005.



### 3.6.6 Expression von *NvWntA*

*NvWntA* zeigt ein dynamisches Expressionsmuster. Mit den ersten Anzeichen der Gastrulation beginnt die *NvWntA* mRNA Synthese. Eine Besonderheit der Entwicklung von *Nematostella* ist die Präsenz von zwei, manchmal drei Stellen auf der Oberfläche der Blastula, an denen gleichzeitig Einsenkungen erscheinen. Um alle diese Einsenkungen findet man eine zirkuläre *NvWntA* Expression. Nur wenig später findet man bei den Embryonen nur noch eine dieser Einsenkungen, an welcher der eigentliche Invaginationsvorgang beginnt. Alle invaginierenden Zellen exprimieren zunächst *NvWntA*. Kurz darauf sind es nur noch Zellen des neu gebildeten Pharynx. Im weiteren Verlauf der Gastrulation wird der Blastoporus zunehmend schlitzförmig. Gleichzeitig zu dieser morphologischen Asymmetrie entwickelt auch das *NvWntA* Expressionsmuster eine Asymmetrie. Auf einer Seite des Blastoporus ist die Expressionsdomäne deutlich breiter als auf der gegenüberliegenden. Diese Asymmetrie wird im Verlaufe der Entwicklung der Planularlarve immer ausgeprägter. Mit Beginn der Metamorphose zum Primärpolypen geht diese Asymmetrie wieder verloren. Sowohl im Primärpolypen als auch im adulten Tier ist das Transkript in einem gleichmäßigen Ring um den Blastoporus exprimiert.

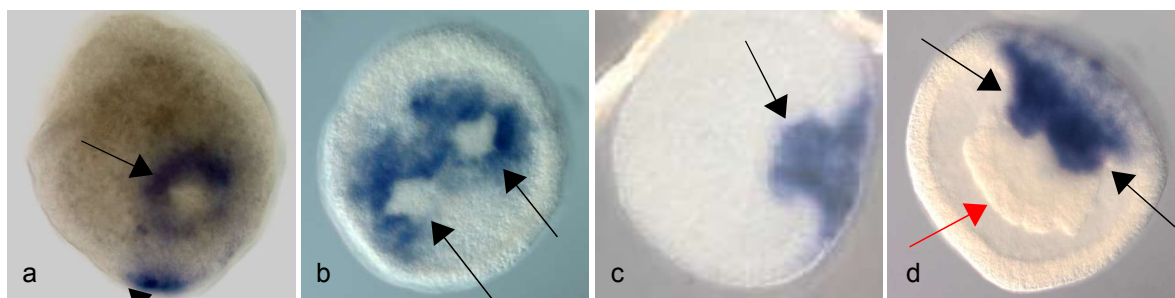


Abb.28: Übersicht über die *NvWntA* Expression in der frühen Gastrulation.

a) Frühe Gastrula, zwei Einsenkungen (Pfeile) mit *NvWntA* Expression; Aufsicht auf eine Einsenkung. b) Frühe Gastrula, Aufsicht auf 2 Einsenkungen (Pfeile). c) Beginn der Invagination, alle invaginierenden Zellen (Pfeil) exprimieren *NvWntA* (Blastoporus rechts). d) Fortgeschrittene Invagination, nur ektodermales Pharynxgewebe zeigt eine Färbung (Pfeile), zu Endoderm spezifiziertes Gewebe exprimiert kein *NvWntA* (roter Pfeil). d) Bild: Kusserow et al., 2005.

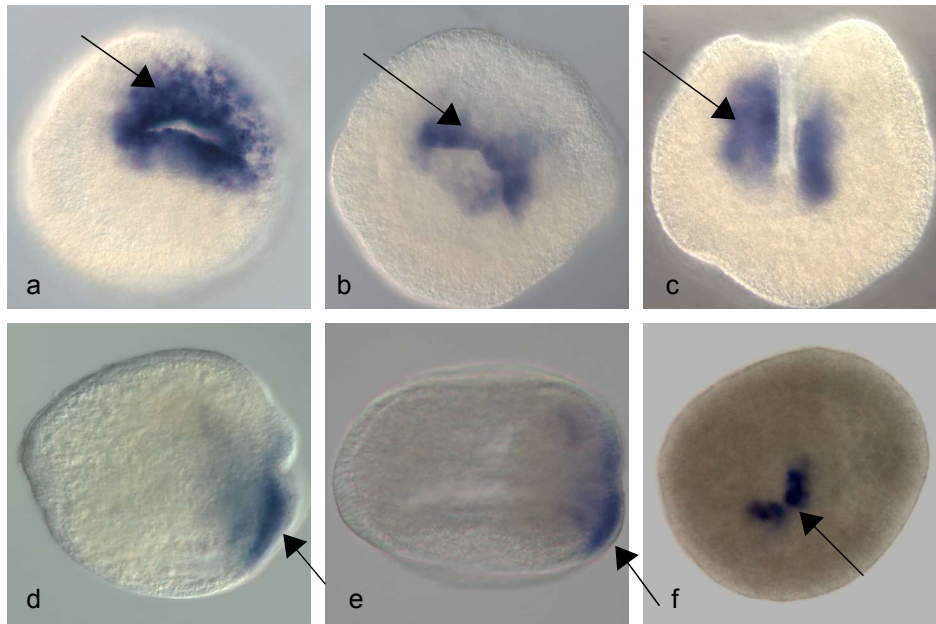


Abb.29: Asymmetrische *NvWntA* Expression.

a,b,c) Verlauf der *NvWntA* Expression in der Gastrulation. Zunehmende Asymmetrie mit größerer Expressionsdomäne auf einer Seite des Blastoporus (Pfeile).

a,b) Aufsicht auf den Blastoporus. c) Blastoporus nach oben.

d,e,f) Asymmetrische Expression stark einseitig (Pfeile). d) Lateralansicht auf frühe Planula.

e) Lateralansicht mittlere Planula. f) Aufsicht auf den Blastoporus einer mittleren Planula.

Bilder: (b,c,d,f) Kusserow et al., 2005.

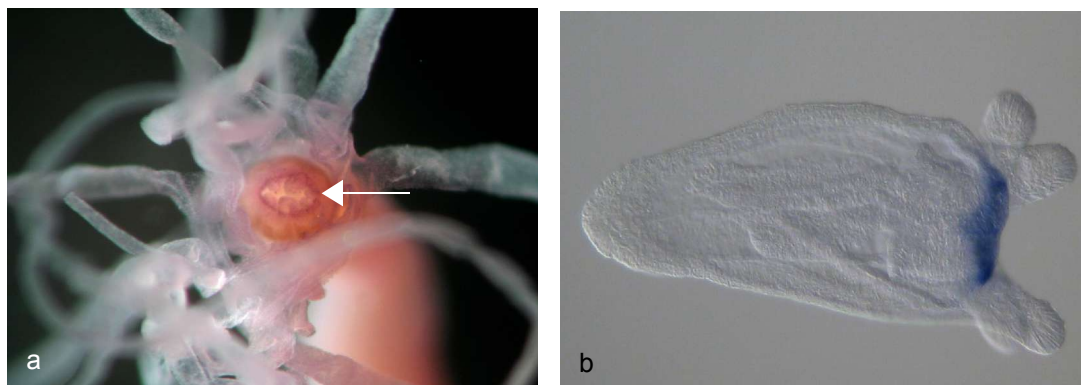


Abb.30: Zirkuläre *NvWntA* Expression in Primärpolypen und adulten Tieren.

a) Aufsicht auf den Mund eines adulten Tieres, *NvWntA* ist ringförmig exprimiert (Pfeil)

b) Lateralansicht eines Primärpolypen, *NvWntA* zeigt eine zirkuläre Expression, Blastoporus rechts.

### 3.7 Überexpression durch Injektion von *NvWnt11* mRNA in *N. vectensis*-Embryonen

Um Hinweise auf die Funktion der Wnt-Transkripte in *N. vectensis* zu erhalten, wurden Überexpressionsexperimente durch mRNA Injektion in frühe Embryonen durchgeführt. *NvWnt11* eignet sich in besonderem Maße für diese Experimente, da dieses Transkript sehr früh in der Individualentwicklung wirkt (siehe Expressionsdaten). Daher war die Aussicht die mRNA zu dem Zeitpunkt ihrer Wirkung überzuexprimieren, sehr gut. Die erste Kernteilung von *N. vectensis* erfolgt in Abhängigkeit von der Kulturtemperatur ca. 3 h nach der Befruchtung. Die folgenden beiden Kernteilungen erfolgen im Abstand von ca. 1 h und verlaufen synchron zueinander. Die eigentlichen Zellteilungen sind bis nach der vierten Kernteilung lichtmikroskopisch oft nicht sichtbar. Ob tatsächlich immer vollständige Zellmembranen zwischen den Blastomeren liegen oder der Zeitpunkt, zu dem Zellmembranen jeweils gebildet werden, individuell verschieden sein kann, ist noch unklar. Die schlechte Sichtbarkeit beziehungsweise das Fehlen von Zellmembranen erschwert die Injektion in die Embryonen, da das Blastomer, in das injiziert werden soll, ebenso wie der Status der Frühentwicklung *in vivo* nicht bestimmt werden kann. Daher ist die Injektionsstelle rein zufällig. Die Injektion von *NvWnt11* mRNA in frühe Stadien bewirkt Störungen der Gastrulation und der axialen Musterbildung. Bei vielen der injizierten Individuen mißlang die Gastrulation. Die Tiere verharrten in einem blastulaähnlichen Zustand. Obwohl das Endoderm nicht normal gebildet werden konnte hatten diese Tiere einen funktionsfähigen Wimpernschopf am animalen Pol. Die Tiere blieben in diesem Zustand, waren aber nicht überlebensfähig, da sie keine Nahrung aufnehmen konnten. Anderen Individuen gelang die Gastrulation, es traten jedoch Störungen der axialen Musterbildung auf. Dies manifestierte sich zumeist in dem Unvermögen, die Tentakel des Primärpolypen korrekt zu bilden. Um herauszufinden ob die Musterbildung der Tiere lediglich verzögert wird bis die injizierte mRNA vollständig abgebaut war, wurden lebende und keine fixierten Tiere dokumentiert.

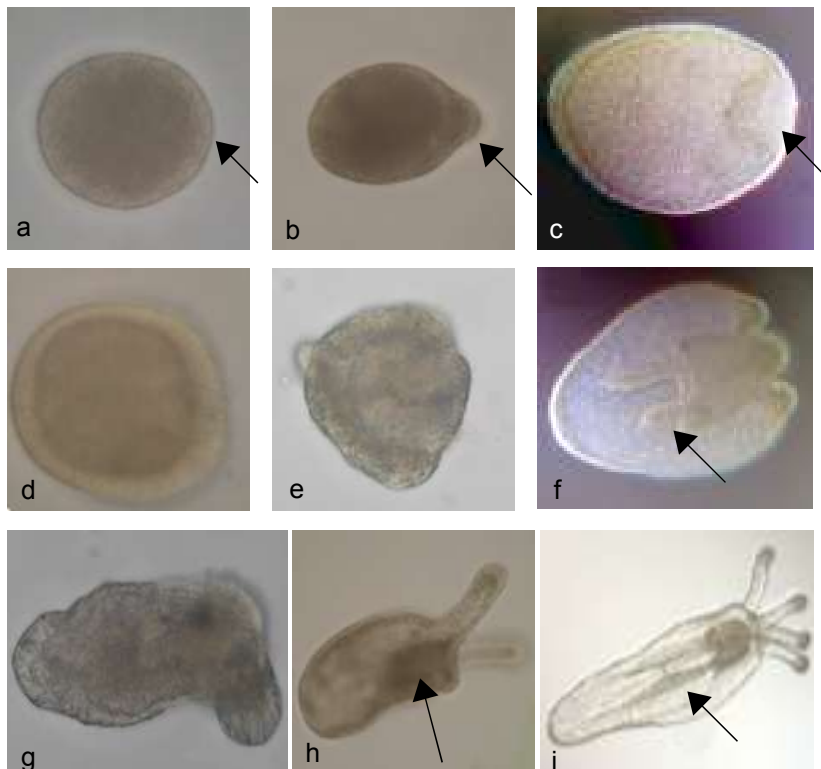


Abb.31: Durch Injektion von *NvWnt11* erzeugte Störungen an lebenden Tieren.

a) Störungen der Gastrulation 4 d nach der mRNA Injektion (frühe Planula). a,b) Es sind keine Anzeichen der Blastoporusformation gegenüber des Wimperschopfes zu sehen (Pfeil). b) Endodermales Gewebe wird nach außen abgegeben (Pfeil). d,e) späte Planulalarven 7 d nach Injektion. Mesenterienanlagen sind nicht sichtbar. g,h) Tentakelbildungsdefekte 11 Tage nach der Injektion. g) Nur ein Tentakel wurde ausgebildet, Mesenterien fehlen. h) Primärpolyp mit 2 Tentakel, Mesenterien fehlen, der Pharynx (ektodermaler Ursprung) ist jedoch sichtbar (Pfeil). Apikaler Pol der Tiere in allen Bildern rechts. i,j,k) unbehandelte Tiere. i) frühe Planula mit Blastoporus (Pfeil). j) späte Planula mit Mesenterienanlagen (Pfeil). k) Primärpolyp mit 4 Tentakel und Mesenterien (Pfeil). c) Frühe Planula, Normalentwicklung. f) Späte Planula mit Mesenterienanlagen (Pfeil). i) Primärpolyp mit Mesenterien (Pfeil) Normalentwicklung.

Bilder unbehandelter Tiere: (c,f,i) Fritzenwanker und Technau 2002.

### Statistische Auswertung der Injektionsexperimente

Es wurden in 107 *N. vectensis*-Embryonen jeweils 1 nl mRNA Lösung (40 pg / nl), in 100 jeweils 1 nl (450 pg / nl) in eines der Blastomeren injiziert. Bei 35 Embryonen wurde als Kontrolle Wasser injiziert. 80 Tiere wurden auf die gleiche Weise wie die Injizierten mit Cysteinlösung aus ihrer Gallerte gelöst und 127 Tiere blieben völlig unbehandelt. Die Auswertung erfolgte am 11. Tag nach der Befruchtung, da zu diesem Zeitpunkt die unbehandelten Kontrolltiere die

Metamorphose zum Primärpolypen abgeschlossen hatten. Im Vergleich der unbehandelten Tiere mit den cysteinbehandelten ist ein leichter Anstieg bei morphologisch anormalen Tieren sowie der Sterberate der Tiere zu beobachten. Bei den mit Wasser injizierten Tieren war wiederum eine leichtere Steigerung, sowohl der Anzahl an anormalen Tieren, als auch der Sterberate zu sehen. Der Anteil geschädigter Tiere verdoppelte sich bei einer Injektion von 40 pg *NvWnt11* im Vergleich zu der Wasserinjektion. Bei den Tieren, die eine Injektion mit 450 pg mRNA erhielten, konnte nur eines der vier überlebenden Tiere einen korrekten Primärpolypen entwickeln. Die anderen blieben Planulaähnliche Gebilde ohne sichtbare Mesenterien oder Tentakel. Alle morphologisch anormalen Tiere der Wasser und Cysteinkontrolle starben oder entwickelten sich normalen Tieren mit vier Tentakeln.

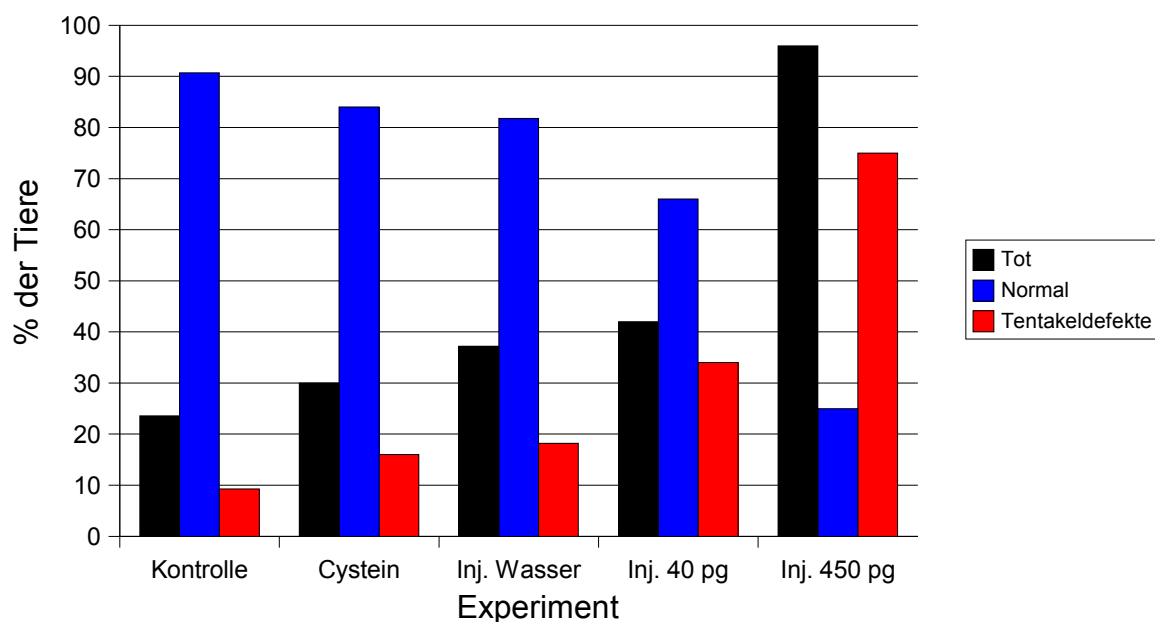


Abb.32: Statistik zu den *NvWnt11* mRNA Injektionen in frühe Teilungsstadien von *N. vectensis*. Die schwarzen Balken zeigen die Anzahl der Tiere, die bis zum 11. Tag nach der Befruchtung starben. Blaue Balken zeigen die Anzahl normal entwickelter Tiere. Rote Balken stehen für die Anzahl der Tiere, die weniger als 4 Tentakel ausgebildet und / oder reduzierte Mesenterien hatten. Kontrolle: Zeigt die Verhältnisse in unbehandelten Kontrolltieren Cystein: Cysteinbehandelte Tiere Inj.Wasser: Bei Tieren denen 1 nl Wasser injiziert wurde. Inj. 40 pg: Bei Tieren, die eine Injektion mit 40 pg mRNA erhielten und Inj. 450pg: Bei Tieren denen 450 pg *NvWnt11* injiziert wurden.

### 3.8 Fremdexpression durch Injektion von *NvWnt11* mRNA in *Xenopus laevis* Embryonen

Die Injektion von Wnt-mRNA aus verschiedenen Organismen in frühe *Xenopus laevis* Embryonen zeigt deutliche Effekte. Die mRNA-Injektion von positiv wirkenden Komponenten des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalweges führt zur Verdoppelung der Hauptkörperachse und der Entwicklung von zwei Köpfen. Die Injektion von positiv wirkenden Komponenten des PCP-Signalweges führt hingegen zu Störungen der Gastrulation. Den Embryonen gelingt daraufhin die korrekte Trennung der Keimblätter nicht. Diese Effekte ist jeweils abhängig davon, in welche Blastomere des 4-Zellstadiums die mRNA injiziert wird. Die Verdoppelung der Körperachse tritt nur auf, wenn die Injektion in die Blastomere erfolgt, aus denen sich der ventrale Teil des Frosches entwickelt. Der Gastrulationsdefekt tritt dagegen nur auf wenn in die dorsalen Blastomeren injiziert wird. Daher kann die Injektion von mRNA in *Xenopus laevis* Hinweise darauf liefern, welcher dieser beiden Signalwege von einem bestimmten Wnt-Liganden ausgelöst wird. Bei allen Injektionsexperimenten wurden 4 nl mRNA-Lösung in zwei der Blastomere von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen injiziert. Dabei wurde immer entweder in beide dorsale- oder beide ventrale Blastomere injiziert. Die Konzentration der mRNA lag zwischen 12,5 und 250 pg / nl. Daraus ergeben sich Mengen von 50 pg – 1 ng pro injiziertes Blastomer.

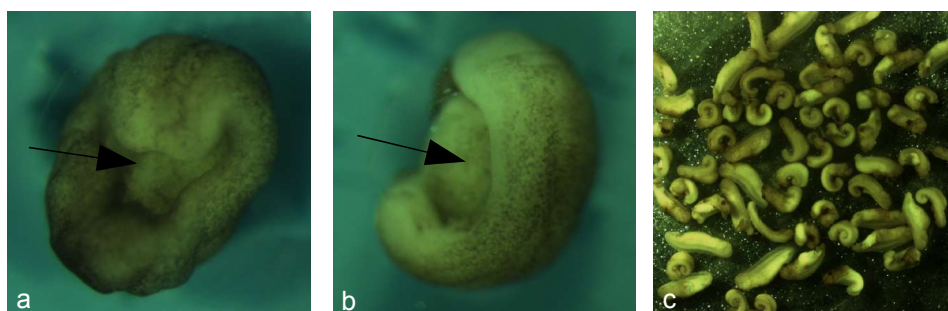


Abb.33: Effekt der Injektion von *NvWnt11* mRNA in frühe *Xenopus laevis* Embryonen.

a,b) Phänotyp nach der Gastrulation (20 Stunden nach der Befruchtung). Die Embryonen konnten die Gastrulation nicht vollenden, der Blastoporus wurde nicht geschlossen. Endodermales Gewebe ist sichtbar (Pfeile). c) Übersicht über injizierte Tiere (36 Stunden nach der Befruchtung). Ein großer Anteil der Tiere ist stark nach einer Seite hin gekrümmt.

### Statistik der *NvWnt11* mRNA-Injektionen in frühe Teilungsstadien von *Xenopus laevis*

Die Injektion von *NvWnt11* mRNA in frühe Teilungsstadien von *Xenopus laevis* führt bei der Injektion in die dorsalen Blastomeren zu starken Gastrulationsdefekten mit hoher Penetranz. Bei den Kontrollinjektionen in die ventralen Blastomeren wurden nur wenige dieser Defekte beobachtet, die vermutlich auf Injektionen in die falschen Blastomeren zurückzuführen waren. Die Injektion von *NvWnt11* in die dorsalen Blastomere erzeugt, wie auch die Injektion des endogenen Orthologes (*XWnt11*), einen Gastrulationsdefekt. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und schon durch relativ geringe Mengen an mRNA zu erreichen (50 pg / dorsales Blastomer). Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit wurde die Daten in Prozentsätzen von allen behandelten Tieren angegeben. Die absoluten Zahlen der Einzelexperimente befinden sich im Anhang.

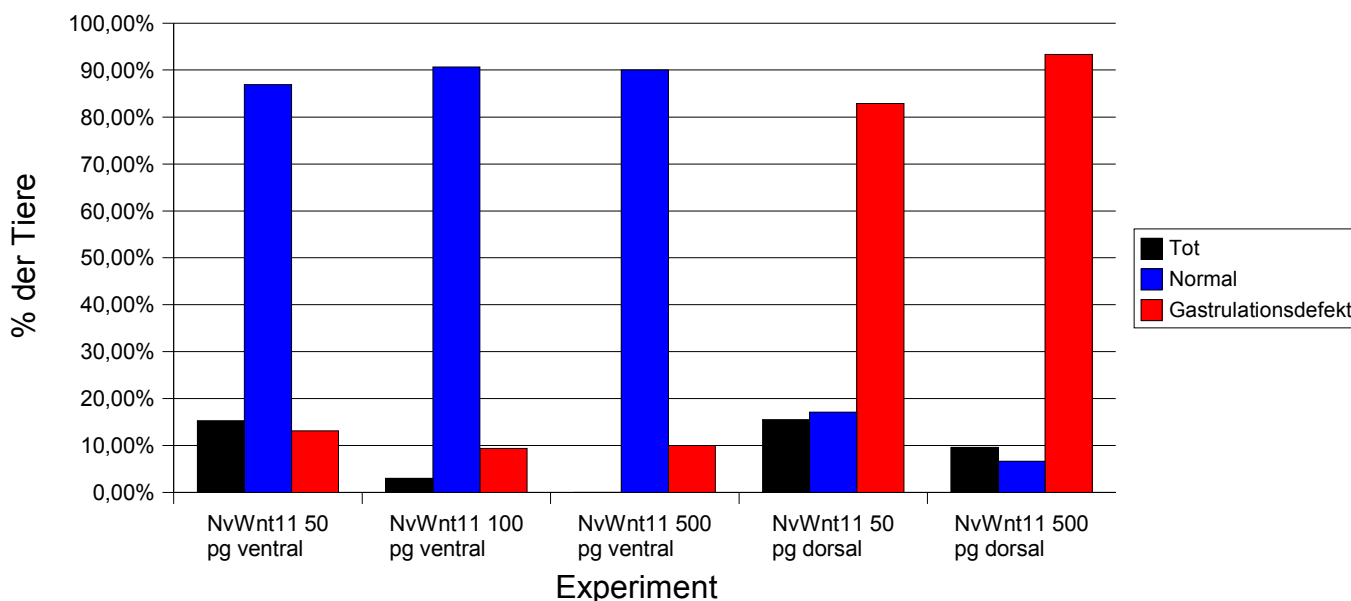


Abb.34: Statistik zu den *NvWnt11* mRNA Injektionen in vierzellige *Xenopus laevis* Embryonen. Die schwarzen Balken zeigen die Anzahl der Tiere, die bis zum 2. Tag nach der Befruchtung starben. Blaue Balken zeigen die Anzahl normal entwickelter Tiere. Rote Balken stehen für die Anzahl der Tiere, die den Gastrulationsdefekt aufwiesen. Die Menge an mRNA sowie ob in beide ventrale oder beide dorsale Blastomere injiziert wurde ist unter den zugehörigen Balken notiert.



### 3.9 Rettung des vom *XWnt11*-Morpholino erzeugten Funktionsverlustes durch die Koinjektion von *NvWnt11*

Morpholinos sind Oligonukleotide mit revers komplementärer Sequenz zur endogenen Ziel-mRNA. Diese Oligonukleotide können an das Zieltranskript binden und verhindern dort die Translation des Transkriptes. Das Morpholino kann nicht wie andere reverskomplementäre RNA-Moleküle durch endogene RNAsen abgebaut werden, daher ist der Effekt dieser Moleküle dauerhafter. Der durch die Injektion von *XWnt11* Morpholino (*XWnt11Mo*) in frühe *Xenopus laevis* Embryonen erzeugte Phänotyp ähnelt optisch dem der Injektion von endogenem *Wnt11* oder auch dem von *NvWnt11*. In beiden Fällen gelingt es dem Embryo nicht, die Keimblätter während der Gastrulation korrekt zu trennen (Pandur, 2002; Winklbauer, 2001). Am Ende der Gastrulation gelingt es dem Embryo nicht, sich um das neu entstandene Endo- und Mesoderm herum zu schließen. In diesem Experiment sollte überprüft werden ob der Phänotyp der *XWnt11Mo* Injektion durch die Injektion von *NvWnt11* abgemildert oder vollständig korrigiert werden kann. Daraus lässt sich schließen, daß die Funktion von *Wnt11* im Verlaufe der Evolution so konserviert wurde, daß die mRNA aus *N. vectensis* die Funktion des endogenen Transkriptes des Frosches ersetzen kann.

Statistik der Koinjektionsexperimente von *XWnt11* Morpholino und *NvWnt11* mRNA in dorsale Blastomere der frühen Teilungsstadien von *Xenopus laevis*

Durch die Koinjektion von *NvWnt11* und *XWnt11Mo* kann, im Vergleich mit der Injektion des Morpholinos allein, die Sterblichkeit der injizierten Embryonen verringert und die Anzahl der Tiere mit Gastrulationsdefekten reduziert werden. Die Reduktion des Phänotyps ist zudem konzentrationsabhängig. Die Injektionsexperimente von *NvWnt11* und die Koinjektionsexperimente mit *XWnt11Mo* und *NvWnt11* erzeugen die gleichen Ergebnisse wie die Injektion des entsprechenden endogenen Gens. Absolute Zahlen befinden sich im Anhang.



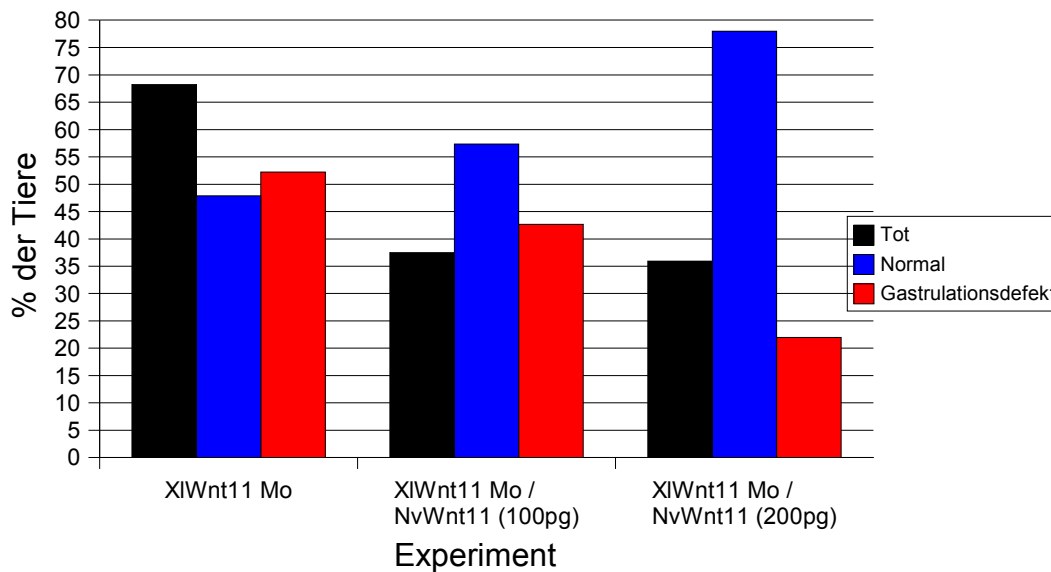


Abb.35: Statistik zu den *NvWnt11* mRNA / *XIWnt11* Morpholino Koinjektionen in vierzellige *Xenopus laevis* Embryonen.

Die schwarzen Balken zeigen die Anzahl der Tiere, die bis zum 2. Tag nach der Befruchtung starben. Blaue Balken zeigen die Anzahl normal entwickelter Tiere. Rote Balken stehen für die Anzahl der Tiere, die den Gastrulationsdefekt aufwiesen. Die Menge an mRNA die in beide dorsale Blastomere injiziert wurde ist unter den zugehörigen Balken notiert.

### 3.10 Injektionen von *NvWntA* mRNA in *Xenopus laevis* Embryonen

Die Funktion der Liganden der WntA Subfamilie ist vollkommen unbekannt. Um Informationen darüber zu erhalten, ob dieser Ligand aus *N. vectensis* eine Duplikation der Körperachse oder einen Gastrulationsdefekt bei *Xenopus laevis* bewirken kann, wurde diese mRNA in *Xenopus* injiziert. Dies sollte Hinweise auf die mögliche Funktion dieser Liganden im  $\beta$ -Catenin abhängigen- oder PCP-Signalweg erbringen.

Es wurde pro Blastomer zwischen 50 pg und 1 ng mRNA-Lösung injiziert. Neben Gastrulationsdefekten bei der Injektion von *NvWntA* mRNA in die dorsalen Blastomere wurde in 5% der Fälle in einem Einzelexperiment auch eine zweite Körperachse durch die Injektion dieser mRNA in die ventralen Blastomeren induziert.

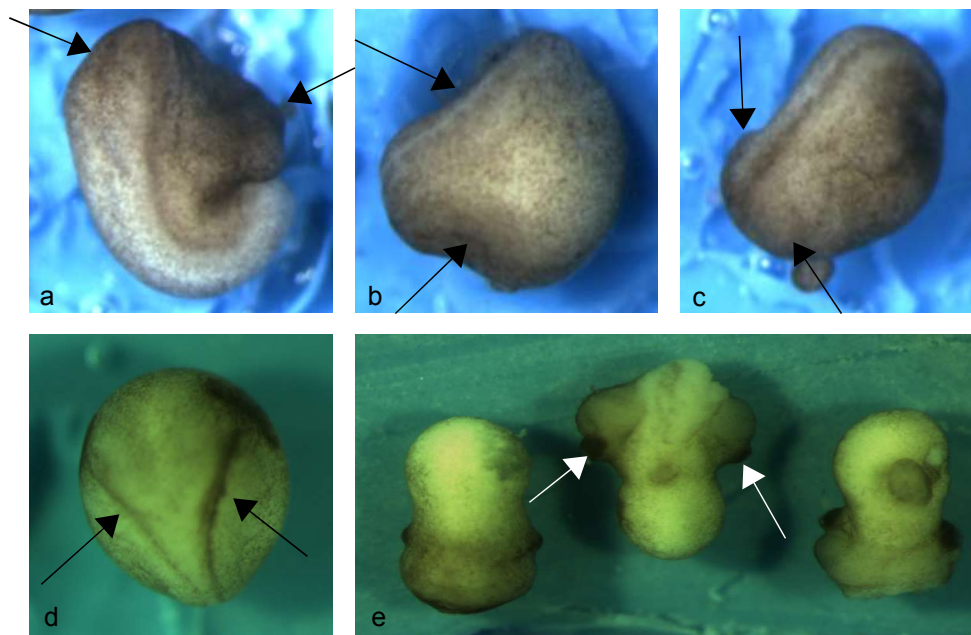


Abb.36: Überexpression von *NvWntA* in den ventralen Blastomeren von *XI* Embryonen. a,b,c) Induktion einer zweiten Körperachse, beide Körperachsen sind markiert (Pfeile) Phänotyp nach 40 Stunden Entwicklung. d) Kontrollinjektionen von 50 pg *XWnt8* in die beiden ventralen Blastomeren. Phänotyp nach 36 Stunden Entwicklung; deutlich sichtbar sind zwei Neuralrohre (Pfeile) e) Kontrollinjektion mit *XWnt8*: Phänotyp nach 3. Tagen Entwicklung mit Verdoppelung von Kopfstrukturen (Pfeile).

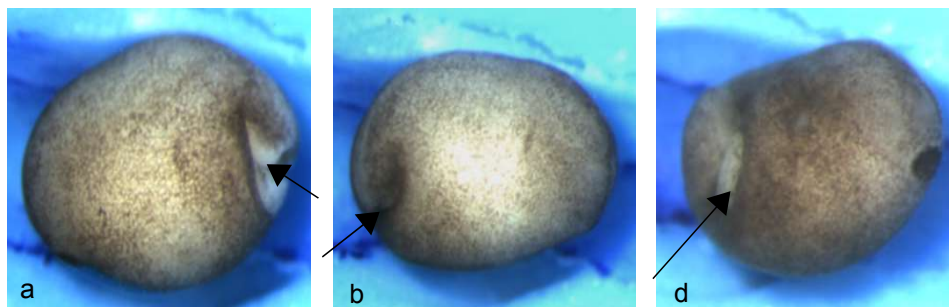


Abb.37: Überexpression von *NvWntA* in den dorsalen Blastomeren von *XI* Embryonen. a,b,c) Verschiedene Ansichten von Embryonen mit Injektionen in die dorsalen Blastomere. Die Injektion erzeugt Gastrulationsdefekte, wobei der Phänotyp nach 24 Stunden Entwicklung deutlich milder ist als bei der Injektion von *NvWnt11* oder *XWnt11*. Der Blastoporus hat sich nicht vollständig geschlossen (Pfeile).

Statistik der *NvWntA* mRNA-Injektionen in *Xenopus laevis* Embryonen

Die Injektion von *NvWntA* mRNA in ventrale Blastomere von *Xenopus laevis* erzeugt in seltenen Fällen eine Verdoppelung der Hauptkörperachse, allerdings mit einer deutlich geringeren Penetranz als die Injektion von *XWnt8*, *XWnt1* oder anderen Komponenten des  $\beta$ -Catenin abhängigen Wnt Signalweges aus *Xenopus laevis*. Absolute Zahlen befinden sich im Anhang S. XXX.

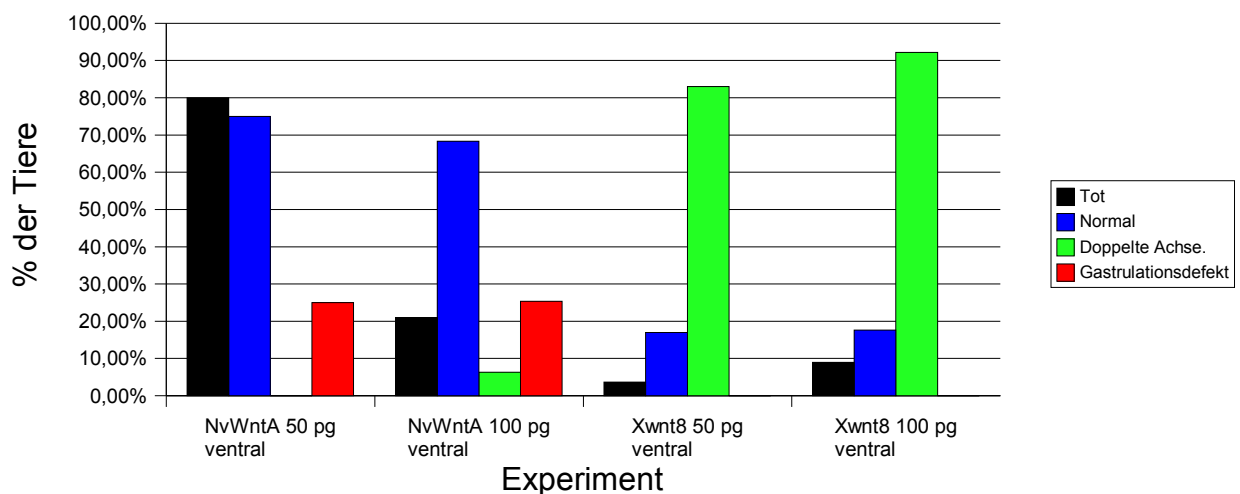


Abb.38: Statistik zu den *NvWntA* mRNA Injektionen in ventrale Blastomere von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen.

Die schwarzen Balken zeigen die Anzahl der Tiere, die bis zum 2. Tag nach der Befruchtung starben. Blaue Balken zeigen die Anzahl normal entwickelter Tiere. Rote Balken stehen für die Anzahl der Tiere, die den Gastrulationsdefekt aufwiesen. Grüne Balken stehen für die Tiere mit einer Verdopplung der Hauptkörperachse. Die Menge an mRNA die in beide ventrale Blastomere injiziert wurde ist unter den zugehörigen Balken notiert.

Die Injektion von *NvWntA* in dorsale Blastomere vierzelliger *Xenopus laevis* Embryonen erzeugt Gastrulationsdefekte, die weniger stark ausgeprägt sind und auch weniger häufig auftreten als bei der Injektion von endogener *Wnt11* mRNA oder anderen positiv wirkenden Komponenten des PCP-Signalweges.

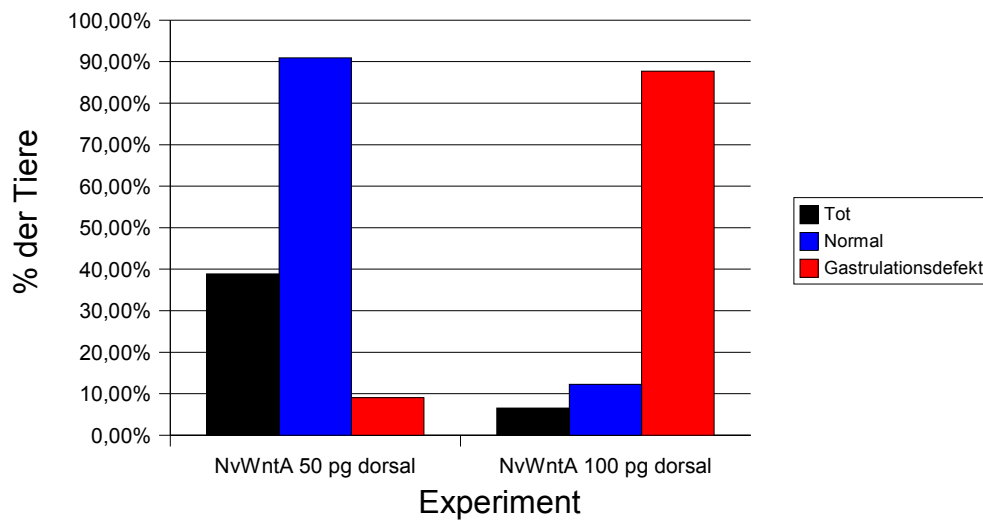


Abb.39: Statistik zu den *NvWntA* mRNA Injektionen in dorsale Blastomere von vierzelligen *Xenopus laevis* Embryonen.

Die schwarzen Balken zeigen die Anzahl der Tiere, die bis zum 2. Tag nach der Befruchtung starben. Blaue Balken zeigen die Anzahl normal entwickelter Tiere. Rote Balken stehen für die Anzahl der Tiere, die den Gastrulationsdefekt aufwiesen. Die Menge an mRNA die in beide ventrale Blastomere injiziert wurde ist unter den zugehörigen Balken notiert.

Möglicherweise kann *NvWntA* aufgrund seiner evolutionären Distanz zu Vertebraten sowohl den  $\beta$ -Catenin abhängigen Signalweg, als auch den PCP-Signaweg auslösen, da der Ligand noch Merkmale aufweist, die es ihm ermöglichen an Komponenten zu binden, die entweder im  $\beta$ -Catenin-abhängigen oder im PCP-Signalweg zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade führen.

#### 4. Diskussion

Für das Verständnis des Verlaufs der Evolution und der Genese von Körperbauplänen, von sehr einfachen Tieren bis hin zum Menschen, ist es von fundamentaler Bedeutung, die molekularen Mechanismen, die zur Realisierung von Körperachsen und Körperbauplänen führen, zu verstehen. Die hochkonservierten molekularen Mechanismen, welche die Achsenbildung in bilateralsymmetrischen Tieren steuern, bestehen aus einem limitierten Satz an Signalkaskaden, die sehr früh in der Evolution entstanden sind. Um den Ursprung der Wnt Signalkaskaden zu analysieren, wurden Wnt-Liganden aus der evolutionär ältesten Tiergruppe mit einer Körperachse, den Cnidaria, auf ihre Phylogenie, Expression und Funktion hin untersucht.

##### 4.1 Vervollständigung von Wnt Transkriptsequenzen aus *N. vectensis*

Alle zuvor bekannten Transkriptfragmente (*NvWnt1*, *NvWnt4*, *NvWnt7a*, *NvWnt10*, *NvWnt11*, *NvWntA* (Sturm, 2000), *NvWnt8a* (Holstein und Technau) konnten in 5'- und 3'-Richtung verlängert oder vervollständigt werden. In der 5'-Region der Transkriptsequenzen konnte ein ATG Startkodon identifiziert werden (außer *NvWnt8a*). Die Bereiche, die 5'-seitig der Startkodone identifiziert wurden, sind im Vergleich mit 5'-UTR Bereichen anderer Metazoengene relativ kurz. Ob diese Kürze eine typische Eigenschaft von Cnidaria Transkripten ist oder ein technischer Artefakt, ist unbekannt. Alle Sequenzen reichen 3'-seitig über das Stopkodon hinaus und wurden im 3'-untranslatierten Bereich von Stopkodonen in allen Leserahmen unterbrochen. Am 3'-seitigen Ende wurde in den Sequenzen (außer *NvWnt11*) ein PolyA-Nukleotidbereich identifiziert. Dies und der Vergleich der Wnt-Aminosäuresequenzen anderer Organismen lässt vermuten, daß die identifizierten Wnt-Transkriptsequenzen weitgehend vollständig sind.

Die Sequenz für *NvWnt8a* stammt aus einer EST-Datenbank (Holstein und Technau) und wurde durch ein 3'-RACE Experiment 3'-seitig komplettiert. Bei dieser Sequenz konnte kein Startkodon am 5'-Ende identifiziert werden, sie ist möglicherweise 5'-seitig unvollständig, obwohl in der identifizierten Sequenz 5'-seitig der ersten im Alignment gezeigten Aminosäure ein Stopkodon liegt. Keiner der drei Leserahmen zeigt 5'-seitig des Stopkodons die konservierten

Motive aus anderen Wnt-Sequenzen.

#### 4.2 Alignierung der putativen Wnt Aminosäuresequenzen

Für die phylogenetischen Berechnungen wurden alle Sequenzen in die korrespondierende Aminosäuresequenz übersetzt und Sequenzbereiche 5'-seitig des ersten konservierten Cysteinrestes entfernt. Die entfernten Bereiche kodieren für Signalpeptide. Diese Bereiche sind in ihrer Sequenz nicht konserviert und liefern daher keine Information für Stammbaumberechnungen, können aber stören. *NvWnt2*, *NvWnt5*, *NvWnt6*, *NvWnt7b* und *NvWnt8b* wurden in Hawaii im Labor von Marc Q. Martindale identifiziert und kloniert. Die Sequenzen anderer Tiere wurden Datenbanken entnommen (NCBI und Sanger Institute). Die Sequenzen für *AgWnt6*, *NvWnt6*, *NvWnt8a*, *PvWntA*, *PvWntA*, *AgWntA* und *PvWnt2* sind im Vergleich zu anderen Wnt Sequenzen ihrer Orthologiegruppen kürzer und enden 5'-seitig im codierenden Bereich. 3'-unvollständig war die Sequenz für *PvWntA*. Diese unvollständigen Sequenzen wurden trotzdem in den phylogenetischen Vergleich einbezogen, da sie essentielle Bedeutung für die Aussagen der vorliegenden Arbeit haben. Weitere für Wnt-Liganden kodierende Sequenzen (*NvWnt3* und *NvWnt16*) wurden kürzlich in dem fortschreitende *Nematostella* Genomsequenzierungsprojekt (Joint Genome Institute) identifiziert und in neue phylogenetischen Berechnungen integriert. Diese Sequenzen sind im kodierenden Bereich 3'-seitig unvollständig, die Sequenzinformation reicht aber für aussagekräftige Stammbaumberechnungen aus. Es fehlen bei *NvWnt3* im Vergleich zu anderen bekannten Wnt3 Aminosäuresequenzen 13 Aminosäurepositionen des 3'-terminalen kodierenden Bereiches. Bei *NvWnt16* fehlen im gleichen Bereich 24 Aminosäurepositionen. In diesen neuen Berechnungen wurden zudem weitere kürzlich in den Datenbanken identifizierte Wnt-Sequenzen integriert, die ebenfalls zur Aufklärung der evolutionären Entstehung der heutigen Wnt-Subfamilien beitragen können. Dies waren eine Wnt-Sequenz aus *Ciona intestinalis* (*CiWnt4*) und Sequenzen aus der Spinne *Achaeearanea tepidariorum* (*AtWnt1*, *AtWnt2*, *AtWnt7a*, *AtWnt7b* und *AtWnt16*). Ein Alignment der neuen Sequenzen befindet sich im Anhang s. XXX) Trotz der unbekannten Bereiche in einigen Sequenzen, waren in den phylogenetischen Berechnungen die Sequenzinformationen ausreichend, um konsistente Daten zu

erhalten. Unvollständige Sequenzen wurden benutzt, da keine vollständigen Sequenzen aus der entsprechenden taxonomischen Gruppe verfügbar waren. Die durch SMART und PFAM identifizierten Wnt-Domänen bestehen aus einigen konservierten Regionen, die durch weniger konservierte Bereiche getrennt werden. Diese weniger konservierten Bereiche werden schlecht aligniert. Da das Alignment in diesen Bereichen wichtig für die Qualität der phylogenetischen Rekonstruktion ist, wurden alternative Alignments erzeugt, indem die Gap-penalty in ClustalW verändert wurde. Ein weiteres alternatives Alignment wurde erstellt, bei dem sämtliche Positionen mit mehr als 50% Gaps entfernt wurden. Alle diese Berechnungen ergaben nahezu das gleiche Ergebnis und zeigten die gleiche Aufspaltung in 12 Wnt-Subfamilien.

Die Alignierung der Aminosäuresequenzen ist ein entscheidender Schritt in der Berechnung von molekularen Stammbäumen. Hierbei werden aus Nukleinsäuresequenzen abgeleitete Aminosäuresequenzen nach konservativen und semikonservativen Sequenzmotiven abgesucht und angeordnet. Die verfügbaren Programme zur Alignierung (ClustalW) unterscheiden jedoch nicht nach der Relevanz einer Aminosäureposition für Struktur oder Funktion des Proteins, sondern behandeln alle Aminosäurepositionen gleich. Für die Funktion und die Struktur eines Proteines sind bestimmte Positionen innerhalb einer Aminosäuresequenz sehr wichtig. Andere Positionen haben hingegen kaum Einfluß. So erzeugen die Cysteinreste über Disulfidbrückenbildung untereinander in den Wnt-Liganden die korrekte räumliche Struktur des Moleküls, wodurch erst die Bindung zum spezifischen Rezeptor ermöglicht wird. Auch die für die Funktion der Wnt-Liganden erforderliche Palmitoylierung erfolgt an einem Cysteinrest. Daher wurden die Alignments manuell umfangreich nachbearbeitet und nach Mustern an Cysteinresten untersucht. Die manuelle Nachbearbeitung erzeugt jedoch auch eine individuelle Interpretation eines Alignments. Aus diesem Grund wurden nur solche Positionen bearbeitet, bei denen die besondere Bedeutung für die Funktion des Moleküls eindeutig war.

#### 4.3 Verwandtschaftsverhältnisse der Wnt-Liganden verschiedener Metazoen

Alle aus *N. vectensis* gewonnenen Sequenzen lassen sich anhand der molekularen Stammbäume eindeutig den bekannten Orthologiegruppen aus

anderen Organismen zuordnen. Alle Stammbaumanalysen kommen zu stabilen Abgrenzungen von insgesamt 12 Orthologiegruppen untereinander. Diese Gruppen sind Wnt1-11 sowie WntA. Bis vor kurzem waren Vertreter der Wnt16 Subfamilie nur aus Mammalia bekannt. Neue Sequenzen aus *N. vectensis* (Joint Genome Institute) und der Spinne *Achaearanea tepidariorum* (Akiyama-Oda und Oda, nur in Datenbank veröffentlicht) fallen in Stammbaumberechnungen mit der menschlichen Sequenz zusammen, die demzufolge nicht vertebratenspezifisch ist, sondern eine evolutionär alte Gruppe darstellt. Mit der *NvWnt3* Sequenz (Joint Genome Institute) sind 12 der 13 konservierten Subfamilien in *N. vectensis* vertreten. Lediglich ein Vertreter der Subfamilie Wnt9 konnte bislang in keinem Cnidaria identifiziert werden. Ob diese Subfamilie eine evolutionäre Neuerwerbung der Bilateria ist, in Cnidaria sekundär verloren ging oder es unter den gegebenen Bedingungen bisher nicht gelang, ein Mitglied dieser Gruppe aus *N. vectensis* oder anderen Cnidaria zu identifizieren, bleibt offen.

Organismen gruppe	Wnt 1	Wnt 2	Wnt 3	Wnt 4	Wnt 5	Wnt 6	Wnt 7	Wnt 8	Wnt 9	Wnt 10	Wnt 11	Wnt A	Wnt 16	n.z
<b><i>N. vectensis</i></b>	1	1	1	1	1	1	2	2	?	1	1	1	1	
<b><i>Ecdysozoa</i></b>														
Spinne	1	1			1		2						1	
Insekten	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
Nematode	1*	0	0	0	1	?	?	0	?	0	0	0	0	3
<b>Lophotrochozoa</b>														
Turbellaria					1*									
Polychaet	1	1*		1			1*		1*	1*		1		
Mollusk	1*	1					1*			1*		1		
<b>Chordata</b>														
Tunikat		1	1	1	1	1	2			1	1	1		
Amphioxus	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1			
Mensch	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	0	1	
<b>Ur-Eumetazoa</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	1	

Tab.2: Übersicht über die Verteilung von Wnt Gensubfamilien in verschiedenen Taxa.

Sequenzen, die in eine der Subgruppen fallen (Prud'homme et al 2002; Marsal et al., 2003), aber nicht in der Stammbaumberechnung verwendet wurden, sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Wnt-Sequenzen, die keiner der konservierten Subgruppen zugeordnet werden können, sind als n.z. bezeichnet. Fragezeichen markieren, daß es bislang unbekannt ist, ob in diesem Taxon ein Vertreter dieser Subgruppe vorkommt oder nicht.



12 der 13 Wnt-Subfamilien müssen schon in den letzten gemeinsamen Vorfahren von Cnidaria und Bilateria, den Ur-Eumetazoa, vorhanden gewesen sein. Der Vergleich zeigt, daß nur sieben der Wnt-Genfamilien in Insekten (*Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae*) und nur fünf in *Caenorhabditis elegans* vorhanden sind. Es ist in höchstem Maße unwahrscheinlich, daß weitere Gene in den vollständig sequenzierten Genomen dieser Tiere übersehen wurden. Daher müssen diese Genfamilien während der Evolution zu Ecdysozoa verloren gegangen sein. Erstaunlicherweise deckt sich die Wnt-Subfamilien-Zusammensetzung bei *Drosophila melanogaster* (Wnt1, -5, -6, -7, -8, -9 und -10) nicht vollständig mit der der nah verwandten *Anopheles gambiae*. Hier findet man nur 6 Wnt-Sequenzen aus den Orthologiegruppen Wnt1, -5, -6, -9, -10 und -A). Es ist sehr unwahrscheinlich, daß eine engere Beziehung zwischen den Subgruppen Wnt7 und WntA besteht und die Sequenz für Wnt7 in *Drosophila melanogaster* der WntA Sequenz in *Anopheles gambiae* entspricht, da alle Stammbaumberechnungen die einzelnen Gruppen mit sehr guter statistischer Unterstützung gegeneinander abgrenzen. Vermutlich sind Wnt-Genfamilien Wnt7 beziehungsweise WntA unabhängig voneinander in der Evolution dieser beiden Spezies verloren gegangen.

Bezieht man die Sequenzen der Spinne in die phylogenetische Betrachtung mit ein, fehlen HsWnt2 und HsWnt16 Orthologe in Insekten. Jedoch sind sie bei Arachniden, welche als Schwestergruppe der Insekten innerhalb der Arthropoden gelten, noch vorhanden. Dies legt nahe, daß der letzte gemeinsame Vorfahre von Arachniden und Insekten eine komplexere Wnt-Genausstattung besaß, als die rezenten Insekten. Der Genverlust der Subgruppen Wnt2 und Wnt16 steht daher nicht im Zusammenhang mit der Evolution der Arthropoda, sondern ereignete sich im Verlauf der Evolution der Hexapoda. Bei den Lophotrochozoa, die den zweiten großen Zweig der Protostomia bilden, sind bislang keine Vertreter der Subgruppen Wnt3, -6, -8, -11 und -16 bekannt. Es bleibt daher offen, welche der Wnt Genfamilien bei der Trennung der Linien von Deuterostomia und Protostomia vorhanden waren. Der Vergleich zeigt jedoch, daß während der Evolution der Deuterostomia lediglich eine der Wnt Subfamilien (WntA) verloren ging, es aber zu Duplikationen in einigen der Subgruppen kam (Wnt2, -3, -5, -7, -8, -9 und -10). Der Verlust der WntA Subgruppe innerhalb der Deuterostomia liegt wahrscheinlich an der Basis der Vertebratenevolution, da in *Ciona intestinalis* ein Vertreter dieser

Subgruppe sequenziert wurde. Diese Genfamilie ist möglicherweise im Zusammenhang mit den viel diskutierten Duplikations- und Reorganisationsvorgängen innerhalb der Genome an der Basis der Chordatenevolution (Ohno, 1970; Abi-Rached et al., 2002; Panopoulou et al., 2003; Holland, 2003) verloren gegangen.

Die Sequenzen *Celin44*, *Cemom2*, *Ceegl20C* aus *Caenorhabditis elegans* lassen sich in keine der konservierten Subgruppen einordnen. Das *Egl20* Genprodukt ist an der Regulation der Wanderung der Zelle QL beteiligt. Diese Zelle wandert normalerweise von ihrer Geburtsstelle in Richtung posterior. Dies lässt darauf schließen, daß es sich hierbei um ein den PCP-Wnt-Signalweg auslösendes Signal handeln könnte. Das *lin44* Genprodukt spielt eine Rolle in der Etablierung von Zellpolarität von bestimmten Zellen im sich entwickelnden Wurm (Herman und Horvitz, 1994) und in der asymmetrischen Teilung der B-Zelle und somit der Bildung des Schwanzes der Larve. *Mom2* spielt eine Rolle in der Bestimmung des Zellschicksals. Durch eine Mutation in diesem Gen wird der Spindelapparat bei der Teilung der Zelle EMS im 4-Zellstadium des Wurmes falsch polarisiert. Das Resultat sind Störungen in der Mesodermbildung. Sowohl die frühe Expression, als auch die Rolle in der Bildung von Mesoderm, könnten auf die Verwandtschaft dieses Liganden mit der Wnt11 Gruppe hinweisen. *DmWnt8* aus *Drosophila melanogaster* (Genbanknummer: Q9VFX1) lässt sich ebenfalls keiner der Homologiegruppen zuordnen, dieser Sequenz fehlen zudem typische Merkmale anderer Wnt-Sequenzen. In keiner der für diese Arbeit berechneten Stammbäume fällt diese Sequenz mit einer der anderen Wnt8 Sequenzen zusammen. Auch in anderen Untersuchungen zur Phylogenie der Wnt-Liganden konnte diese Einordnung nicht unterstützt werden (Prud'homme et al, 2002; Schubert et al., 2000; Wnt-Homepage Roel Nusse), daher ist eine Zugehörigkeit dieser Sequenz zur Wnt8 Subfamilie unklar. Sowohl in der Orthologiegruppe Wnt7 als auch Wnt8 wurden in *N. vectensis* jeweils zwei verschiedene Sequenzen identifiziert. Diese Sequenzen zeigen keine Orthologie mit den A / B-Unterfamilien des Menschen. Daher sind die Paraloge innerhalb der Wnt7 und Wnt8 Untergruppen in *N. vectensis* vermutlich eine Folge einer Cnidaria- oder Anthozoa-spezifischen Duplikation. *NvWnt8a* und *NvWnt8m* sind zu 33% identisch und haben an 49% ihrer Aminosäurepositionen semikonservative Substitutionen. Die Sequenzen für *NvWnt7a* und *NvWnt7m* sind bis zur Aminosäureposition 152 im Alignment

sowohl auf Aminosäure- wie auch auf Nukleinsäureebene identisch. Da von diesen Transkripten die gesamte Sequenz mit 5'- und 3'- untranslatierten Bereichen bekannt und durchgängig ist, entstehen die beiden Transkripte vermutlich durch trans-splicing aus verschiedenen Vorläufermolekülen. Im nachfolgenden Bereich sind diese Sequenzen zu 42% identisch und an 60% der Positionen sind die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren ähnlich (semikonservativ). Die Position, an der die Sequenzidentität endet, entspricht exakt der Position, an der in genomischen Sequenzen aus mehreren Organismen und verschiedenen Wnt Untergruppen die Grenze zwischen einem Exon und einem Intron liegt (Kusserow, 2001).

Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß bis auf die Wnt9 Subgruppe alle anderen Subgruppen bereits in einem so einfachen Tier wie *N. vectensis* vorhanden sind. Vor wenigen Jahren (Hobmayer et al., 2000) wurde ein einziges Wnt Transkript in dem Hydrozoen *Hydra vulgaris* identifiziert. Es wurde angenommen, daß dieses Transkript das Vorläufermolekül aller anderen Wnt Liganden aus höheren Tieren oder zumindest für die kanonischen Wnt-Liganden darstellt. Die Aminosäuresequenz dieses Wnt-Liganden fällt jedoch in phylogenetischen Berechnungen nicht an die Basis des molekularen Stammbaumes, sondern, mit einer guten statistischen Unterstützung, in die Wnt3 Subgruppe. Kürzlich wurden Fragmente von vier weiteren Wnt-Transkripten aus *Hydra magnipapillata* EST-Banken identifiziert (Bode, Holstein). Vermutlich ist die Anzahl an Wnt-Liganden in Hydrozoen annähernd die gleiche wie in *N. vectensis*.

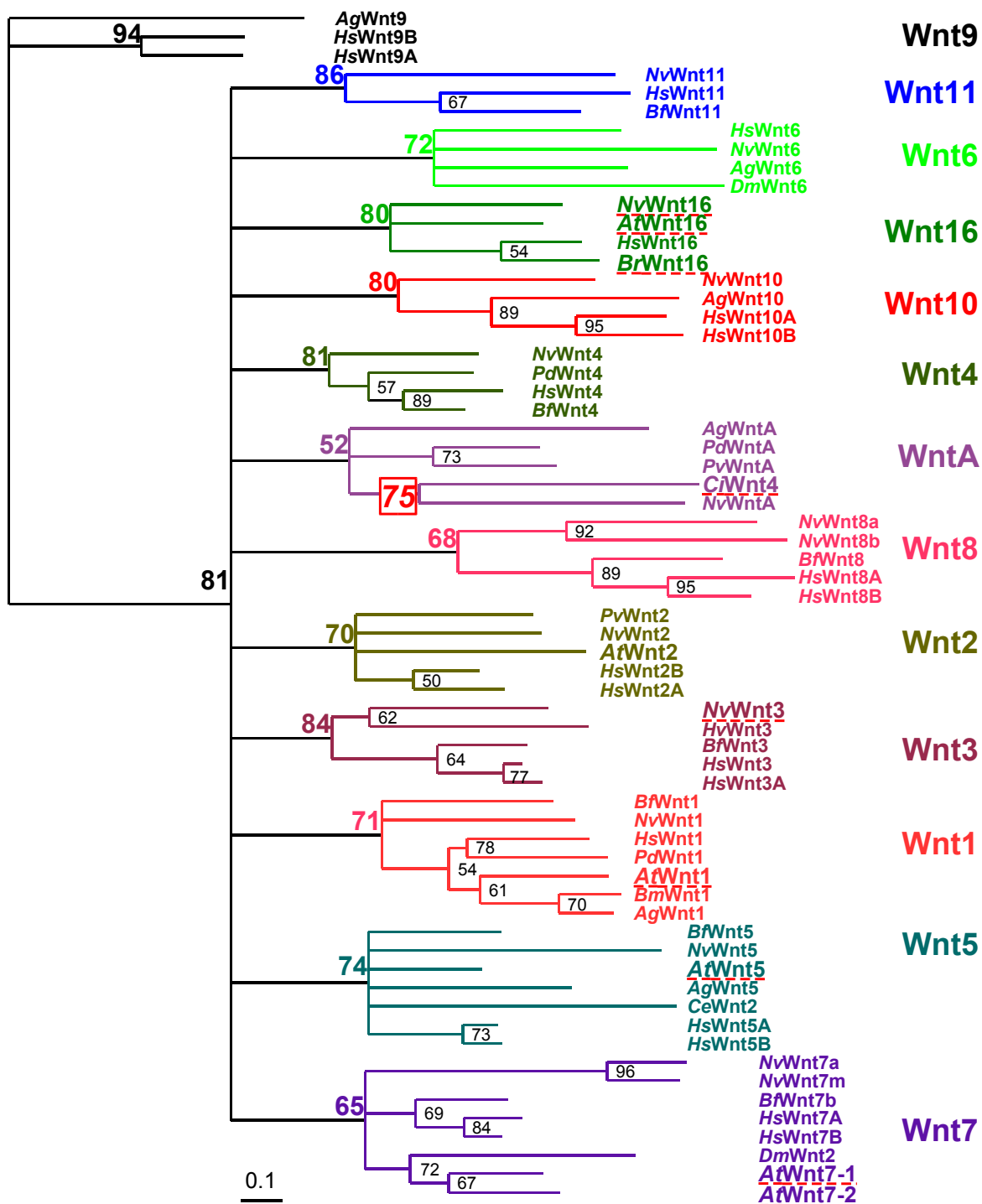


Abb.40: Molekularer Stammbaum der Wnt-Liganden aus verschiedenen Organismen (TreePuzzle). Außengruppe ist AgWnt9, da durch die AfWnt16-Sequenz und die ebenfalls neu hinzugefügte *Brachydanio rerio*-Sequenz (*BrWnt16*) eine konservierte Subgruppe entsteht. Durch die Verwendung als Außengruppe wird AgWnt9 von ihrer Subgruppe getrennt. Neu hinzugefügte Wnt-Liganden sind rot unterbrochen unterstrichen sowie größer und fett dargestellt. Sequenzen der einzelnen Subgruppen sind farblich unterschiedlich, hinter jeder Gruppe steht ihr Name. Die farblich gleichgestaltete Zahl an der Wurzel der Subgruppen zeigt die statistische Unterstützung der Gruppe. Die rote Zahl im roten Kasten zeigt die statistische Unterstützung, mit der CWnt4 und NvWntA einer Gruppe angehören. Der Größenbalken gibt die evolutionäre Distanz an.

#### 4.4 Vorschläge zur Nomenklatur der Wnt-Liganden

Durch die sukzessive Entdeckung von Wnt Genen aus unterschiedlichen Organismen ist die Nomenklatur der Wnt-Liganden im Moment teilweise widersprüchlich. Eine Revision der Nomenklatur wäre wünschenswert. Als Leitfaden für die Nomenklatur wurde in der vorliegenden Arbeit die auf der Wnt-Homepage des Labors von Roel Nusse verwendete benutzt. Um die Herkunft der Wnt-Liganden zu beschreiben, wurde dem Namen des jeweiligen Moleküls die Anfangsbuchstaben der Gattungs- und Artnamen in kursiver Schrift vorangestellt. Paraloge der Gene für einige Wnt-Liganden wurden jeweils mit großen Buchstaben nach der Gruppennummer (A,B) bezeichnet. Dieser Nomenklatur folgend sollte das menschliche Wnt3 Genprodukt in Wnt3B umbenannt werden, da das Paralog dieses Genes bereits als Wnt3A bezeichnet wird. Wnt2 und Wnt13 sind enger miteinander verwandt als mit anderen Gruppen, daher sollten sie als Wnt2A und Wnt2B bezeichnet werden. Wnt14 und Wnt15 sind ebenfalls eng verwandt. Diese beiden Gene sind wiederum verwandt mit der früher beschriebenen Wnt9 Subfamilie, daher sollten sie Wnt9A und Wnt9B genannt werden. Die Subgruppe WntA (Prud'homme et al., 2001) ist von Cnidaria über Anneliden (*Platynereis dumerilii*), Mollusken (*Patella vulgata*) Insekten (*Anopheles gambiae*) und Urochordaten (*Ciona intestinalis*) konserviert und daher nicht, wie bei den Erstbeschreibern diskutiert, eine Lophotrochozoa spezifische Gruppe. Da diese Subfamilie evolutionär sehr alt ist, sollte sie nicht wie bisher von den anderen Subfamilien abgetrennt bezeichnet werden. Da durch frühere Falschzuordnungen die Bezeichnungen Wnt13, Wnt14 oder 15 irreführend wären, könnte diese Gengruppe mit Wnt0 oder mit Wnt17 bezeichnet werden. Transkripte, die durch alternative Spleißvarianten von einem Genlokus erzeugt werden, sollten durch den Namen als solche erkennbar sein, um sie von A/B Paralogen zu unterscheiden. Die fertigen Transkripte, die für die mRNAs *HsWnt2B1* und *HsWnt2B2* kodieren (Katoh et.al, 2000) und zwei Spleißvarianten des *HsWnt16* Transkriptes werden jeweils durch alternative Spleißmuster aus einem einzigen Vorläufertranskript erzeugt. Eine Möglichkeit wäre die Unterscheidung durch angehängte Ziffern. Zum Beispiel für die Spleißvarianten des Genes für Wnt2B *Wnt2B1* und *Wnt2B2*. Die Sequenzen aus *Anopheles gambiae* sind eindeutig den verschiedenen Subfamilien zuzuordnen und sollten

entsprechend benannt werden.

#### 4.5 Evolutionäre Herkunft von Wnt-Liganden

Obwohl die statistische Unterstützung der einzelnen Wnt-Subfamilien in den molekularen Stammbäumen gut ist, reicht die Auflösung der Phylogenie nicht aus, um zwischen den ursprünglichen und den abgeleiteten Wnt-Subfamilien zu unterscheiden. Allerdings erstellt der mit MrBayes erzeugte Stammbaum eine enge Verbindung der Subfamilien Wnt1, Wnt3, Wnt6, Wnt9 und Wnt10. Diese Zusammengehörigkeit wird auch durch die Anordnungen dieser Gene in den Genomen von *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* gestützt.

Möglicherweise repräsentieren diese Gene die evolutionär ursprüngliche Wnt-Genausstattung eines gemeinsamen Vorfahren von Cnidaria und Bilateria (Kusserow et al., 2005). Die reihenweise Anordnung der kodierenden Bereiche nach dem zeitlichen Verlauf ihrer Evolution ist nicht so eindeutig wie die der Hox-Gene (Peterson and Earnisse, 2001), aber signifikant. So liegen die Gene, welche in *Drosophila* für *DmWnt1*, *DmWnt6* und *DmWnt10* kodieren, in gleicher Transkriptionsrichtung direkt hintereinander auf dem Chromosom 2, in der Position 27F. Der Mensch besitzt zwei verschiedene Wnt10 Sequenzen (*HsWnt10A* und *HsWnt10B*). Diese Gene liegen in zwei getrennten Zweiergruppen auf verschiedenen Chromosomen. Auf dem Chromosomenarm 12q13 befinden sich die Gene für *HsWnt1* und *HsWnt10B*, in der Position 2q35 befinden sich die Gene für *HsWnt6* und *HsWnt10A*. Keine dieser Paarungen wird von anderen kodierenden Bereichen unterbrochen. Ebenfalls in unmittelbarer Umgebung auf je einem menschlichen Chromosom liegen die Genpaare *HsWnt3A–HsWnt9A* in der Position 1q42, *HsWnt3–HsWnt9B* auf 17q21 und *HsWnt2–HsWnt16* auf 7q31. Diese Paare sind jedoch durch andere Genen voneinander getrennt (Nusse, 2001). Im Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt zudem auf, daß den Sequenzen der Wnt8 Subfamilie viele Merkmale der anderen Subgruppen fehlen. Darunter die ersten beiden Cysteinpositionen, welche den Mitgliedern der Wnt1 Subgruppe ebenfalls fehlen. Es lässt sich daraus spekulieren, daß in einem Duplikationsereignis aus der Wnt1 Familie die Wnt8-Subgruppe hervorgegangen sein könnte. Bislang konnten keine Wnt-Liganden aus einzelligen Eukarionten, Schleimpilzen wie *Dictyostelium discoideum*, die

jedoch GSK3 $\beta$  besitzen (Plyte et al., 1990) oder Choanoflagellaten (King et al., 2003) isoliert werden. Unklar ist die Situation bei Schwämmen. Hier konnten zwar Mitglieder der Wnt-Signalkaskaden identifiziert werden, Wnt-Liganden selbst konnten dort bislang nicht gefunden werden (Huang und Klein 2004; Meijer et al., 2000; Guidice, 2001; Harwood et al., 1995; Brown und Firtel, 1999 ; Coates et al., 2002). Die Gruppe der Schwämme ist jedoch möglicherweise vor der Evolution der Eumetazoa von diesen divergiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Entstehung der Wnt-Signalkaskade in engem Zusammenhang mit der Evolution von vielzelligen Organismen aus einzelligen Vorfahren, wie den Choanoflagellaten, steht.

#### 4.6 Analyse der Funktion von Wnt-Liganden in *N. vectensis*

##### 4.6.1 Wnt-Liganden mit axialen Expressionsmustern

Um Hinweise auf die Funktion der Wnt Gene zu erhalten, wurden die Expressionsmuster aller bekannten Wnt-Gene aus *N. vectensis* im Verlauf der Juvenilentwicklung von Beginn der Gastrulation bis zum Primärpolypen miteinander verglichen. Jedes der Gene zeigt ein eigenes, von den anderen unterscheidbares Expressionsmuster. Die meisten der Gene sind entlang der Hauptkörperachse, in keisförmigen Domänen um den Blastoporus während der Gastrulation und der oralen Region in der späteren Entwicklung des Tieres exprimiert. Wobei ein Satz an Genen (*NvWnt1*, *NvWnt7b*, *NvWnt4*, *NvWntA* und *NvWnt2*) hintereinander, einander zum Teil überlappend, im Ektoderm des Tieres exprimiert ist. Die *NvWntA* Expression definiert zu Beginn der Gastrulation den Punkt, an dem sich der Blastoporus formiert. Im Verlaufe der Gastrulation vergrößert sich die Domäne, bis sie das gesamte Gewebe, welches durch den neu formierten Blastoporus nach innen gelangt, umfasst. *NvWnt1*, *NvWnt7b*, *NvWnt4* und *NvWnt2* sind um den Blastoporus herum angeordnet, wobei *NvWnt1* am weitesten oral, dann *NvWnt7* und *NvWnt4* erneut weiter aboral exprimiert sind. *NvWnt2* schließlich findet sich wie ein breiter Gürtel um die Mitte des sich entwickelnden Tieres. Die *NvWnt7b* Expression beginnt im Gegensatz zu den anderen genannten Genen erst nach Abschluß der Gastrulation.

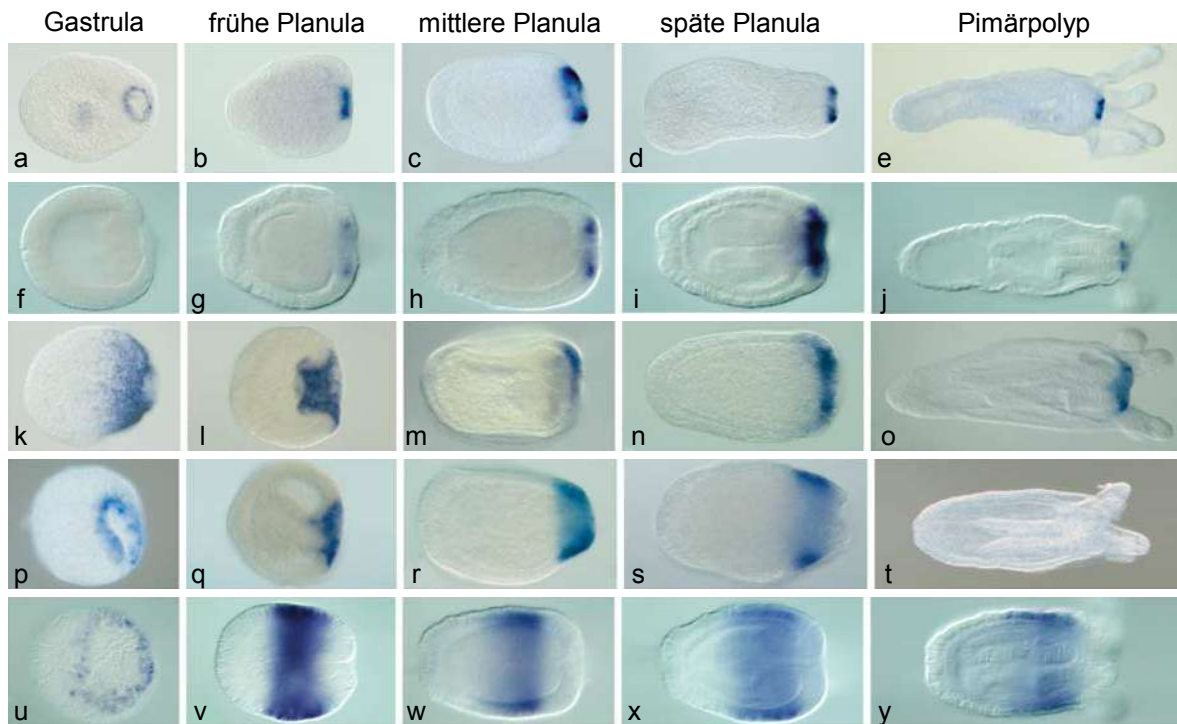


Abb.41: Übersicht über die gestaffelte Expression von Wnt Genen im Ektoderm von *N. vectensis*. a-e) *NvWnt1*. f-j) *NvWnt7b*. k-o) *NvWntA*. p-t) *NvWnt4* und u-y) *NvWnt2* (Bilder: Marc Q. Martindale und Kevin Pang). a,f,k,p,u) In der Gastrula. b,g,l,q,v) In der frühen Planula. c,h,m,r,w) In der mittleren Planula. d,i,n,s,x) in der späten Planula und e,j,o,t,y) im Primärpolypen. Bilder: Kusserow et al. 2005.

Ein zweiter Satz an Transkripten (*NvWnt5*, *NvWnt6*, *NvWnt8b*) ist in einer vergleichbaren Anordnung im Endoderm lokalisiert. Hier liegt die Expressionsdomäne von *NvWnt5* dem Blastoporus am nächsten. Diese Region entwickelt sich zu dem endodermalen Bereich zwischen Pharynx und Tentakelzone. *NvWnt6* und *NvWnt8b* sind weiter aboral, in den Bereichen in denen später die Mesenterien geformt werden, exprimiert.



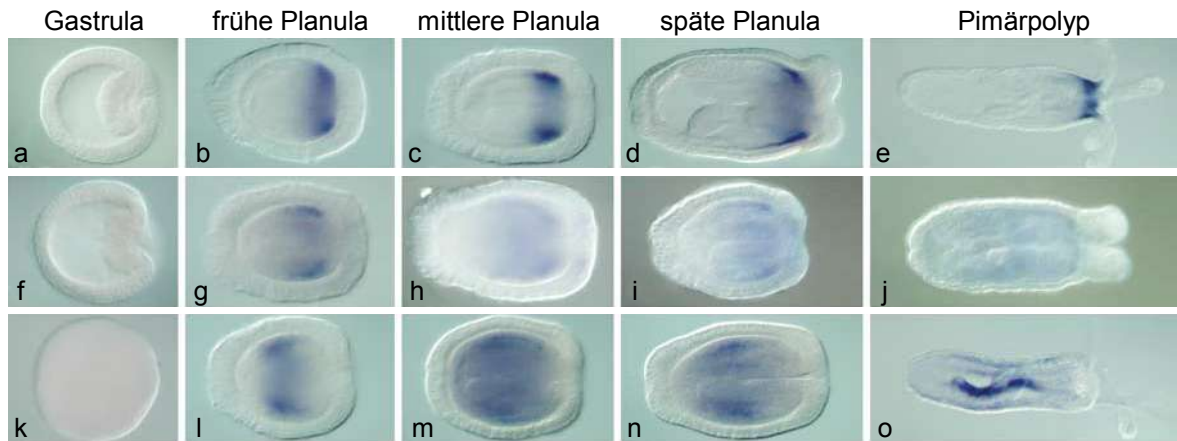


Abb.42: Übersicht über die gestaffelte Expression von Wnt Genen im Endoderm von *N. vectensis*. a-e) *NvWnt5*. f-j) *NvWnt6*. k-o) *NvWnt8b*. a,f,k) In der Gastrula. b,g,l) In der frühen Planula. c,h,m) In der mittleren Planula. d,i,n) In der späten Planula und e,j,o) im Primärpolyp. Bilder: Marc Q. Martindale und Kevin Pang (Kusserow et al., 2005.)

Diese gestaffelte Anordnung verschiedener Wnt-Expressionsdomänen entlang der primären Körperachsen zeigt große Ähnlichkeit mit der Anordnung von Hox-Genexpressionsdomänen bei bilateralsymmetrischen Tieren.

Wnt Gene sind in vielen Tieren zusammen mit Genen wie *Brachyury*, *Forkhead*, *Snail*, *Notch* und *Caudal* exprimiert und representieren eine evolutionär konservierte Anordnung von Genen, die vermutlich ein frühes Organisationszentrum am Blastoporus etablieren (Holland, 2002; Lengyel und Iwaki, 2002). Daß zumindest einige dieser Gene auch in Cnidaria identifiziert wurden (Fritzenwanker et al., 2004; Technau und Scholz, 2003; Martindale et al., 2004), weist darauf hin, daß dieses Signalzentrum keine Neuerung in der Deuterostomie- oder Protostomierevolution darstellt, sondern schon an der Basis der Metazoonevolution von diploblastischen Tieren etabliert wurde. Vermutlich gingen aus den Wnt-Genen, die in diesem frühen Organisationszentrum exprimiert waren, die mesodermalen und neuro-ektodermalen Orthologe aus Ecdysozoa, Lophotrochozoa und Deuterostomiern hervor. Diese Annahme wird weiterhin durch den Umstand gestützt, daß diejenigen Gene, die im Endoderm von *N. vectensis* exprimiert sind (*NvWnt5*, -6, -8), während der Mesodermentstehung, ebenfalls mit einander überlappenden, gestaffelten Expressionsdomänen entlang der anterior-posterior Achse, bei Deuterostomiern gefunden werden können (Davidson und Levine, 2003; McMahon et al., 1991; Hoppler und Moon, 1998). Diese Übereinstimmungen weisen auf eine enge

Verbindung zwischen Endoderm und Mesoderm während der Gastrulation hin und sprechen für eine Funktion dieser alten Genanordnung in der Evolution des Mesoderms. Im sich entwickelnden Gehirn von Vertebraten zeigt der gleiche Satz an Wnt-Liganden, die sich im Ektoderm von *N. vectensis* finden (*NvWnt1*, -2, -4, -7), ebenfalls oftmals eine vergleichbare Anordnung entlang der dorsalen anterior-posterior Achse (McMahon and Bradley, 1990; McGrew et al., 1992; Landesman und Sokol, 1997; Nakagawa et al., 2003). Diese Anordnung führt zu der Hypothese, daß das zentrale Nervensystem der Wirbeltiere durch den gleichen Satz an ektodermalen Wnt-Genen gemustert wird, welcher das Ektoderm der Cnidaria organisiert. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten zeigen, daß während der Gastrulation der Seeanemone *N. vectensis* ein Signalzentrum am Blastoporus aktiv ist, in dem die meisten Wnt Gensubfamilien zusammen exprimiert sind. Die gestaffelte Anordnung entlang der Hauptkörperachse der Planularlarve lässt eine ursprüngliche und zentrale Funktion der Wnt-Genprodukte in der Gastrulation und der Differenzierung von Zellen entlang von Körperachsen wahrscheinlich erscheinen, welche derzeit diskutiert wird (Primus und Freeman, 2004).

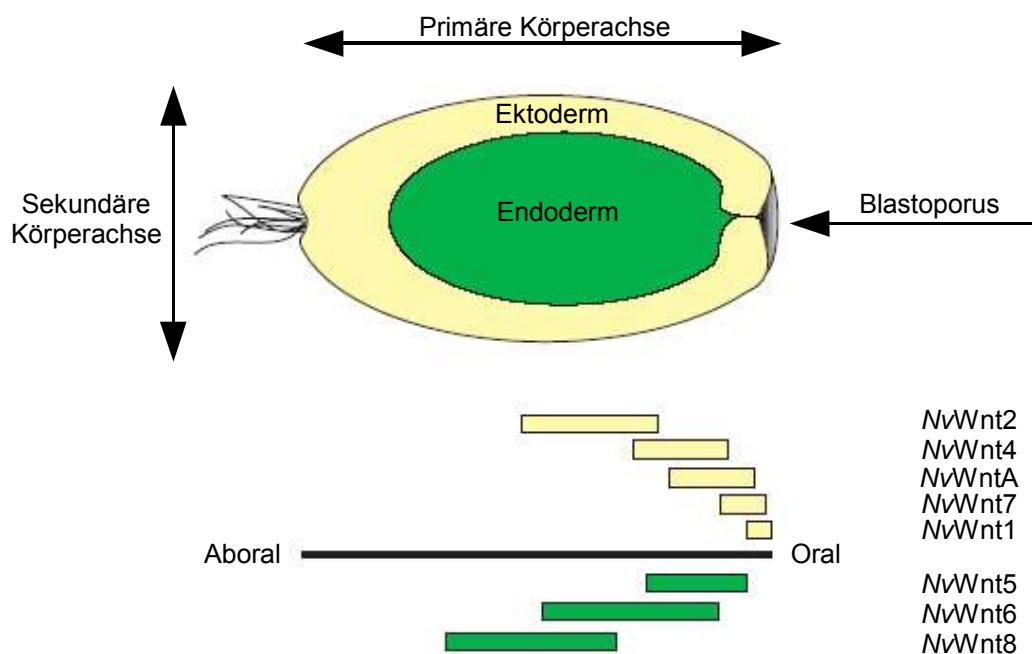


Abb.43: Überlappende Anordnung der Expressionsdomänen von *NvWnt1*, -2, -4, -5, -6, -8 und -A in einer *N. vectensis* Planularlarve.

Der Blastoporus markiert den oralen, der Wimperschopf den aboralen Pol. Ektoderm und ektodermale Expressionsdomänen sind in gelb, Endoderm und endodermale Gene in grün dargestellt. Bild: Kusserow et al., 2005.

#### 4.6.2 Radiärsymmetrie und direktive Achse

Die Radiärsymmetrie der Cnidaria muß bezweifelt werden Sowohl auf der morphologischen Ebene (Stephenson; 1935), als auch auf molekularer Ebene (Finnerty, 2003; Finnerty et al., 2004; Kusserow et al., 2005) sind zahlreiche Merkmale zu finden, die auf die Existenz einer zweiten Körperachse schließen lassen. Da die Moleküle, welche diese zweite Symmetrieachse definieren, in Cnidaria die gleichen sind wie in Bilateria, muß davon ausgegangen werden, daß diese zweite Körperachse im frühesten gemeinsamen Vorfahren von *N. vectensis* und dem Menschen bereits vorhanden war. Die morphologische Radiärsymmetrie der Cnidaria ist daher vermutlich ebenso wie die der Echinodermen ein sekundäres Merkmal. Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der zweiten Körperachse ist die Trennung der Entwicklungslinien des Menschen und Nematostella zu einem Zeitpunkt, an dem die Evolution zur Bilateralsymmetrie gerade erst begonnen hat, die genetische Maschinerie für die Definition der zweiten Symmetrieachse jedoch schon vollständig etabliert war.

#### 4.6.3 Wnt Gene und sekundäre Körperachsen

Wnt Gene spielen eine Rolle in der Musterung von embryonalen Körperachsen. Dies gilt nicht nur für die primäre Achse, sondern auch für die Entstehung der sekundären Körperachsen (Brandhorst und Klein, 2002; Najima et al., 2004). Schon dem Erstbeschreiber von *N. vectensis* (Stephenson, 1935) sind morphologische Asymmetrien aufgefallen. Neben dem schlitzförmigen Blastoporus findet man einen einzigen Syphonoglyphen in einem der beiden spitz zulaufenden Enden des schlitzförmigen Mundes des adulten Tieres. Diese Wimperrinne verläuft vom Mund durch den Pharynx bis in den Gastralraum des Tieres. Obwohl *N. vectensis* wie alle Cnidaria als primär radiärsymmetrisch gilt, zeigen zwei der Wnt-Liganden ein, in Bezug auf die primäre Körperachse, asymmetrisches Expressionsmuster. Die *NvWnt4* Expression fehlt in einem kleinen Sektor in der ansonsten zirkulären Expressionsdomäne. Wnt4-Liganden von Bilateria können über den sogenannten Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  oder PKC-Signalweg die  $\text{Ca}^{2+}$  Ausschüttung ins Zytoplasma bewirken, was ein zentraler Vorgang in der Etablierung von dorsal-ventral Polarität in der Embryonalentwicklung von

bilateralsymmetrischen Tieren ist (Kuhl, 2004). Diese asymmetrische Expression könnte die Folge oder die Ursache für den asymmetrischen Fortschritt der Gastrulation von *N. vectensis* sein.

Auch die Expression von *NvWntA* ist in Bezug auf die Hauptkörperachse asymmetrisch. Diese Asymmetrie beginnt im Verlaufe der Gastrulation, wobei auf einer der längeren Seiten des zunehmend schlitzförmigen Blastoporus die *NvWntA* Expressionsdomäne breiter, auf der gegenüberliegenden Seite jedoch schmaler wird. Diese molekulare Asymmetrie ist, wie die morphologische, in der mittleren Planularlarve am stärksten und lässt während der Metamorphose zum Primärpolypen wieder nach. Die Planularlarve ist auch die Lebensphase des Tieres, in der eine dorso-ventrale Polarität einen Vorteil für den Organismus bringen könnte, da es frei umherschwimmt und sich im dreidimensionalen Raum orientieren muß. Bei der sessilen Lebensweise des adulten Polypen hingegen ist die Radiärsymmetrie ein Vorteil. Daher zeigen viele sessile Organismen sekundäre Reduktionen ihres primär bilateralsymmetrischen Körperbaus. Das Gewebe, das während der Gastrulation in den *N. vectensis* Embryo einwandert, exprimiert *NvWntA* auf einer Seite des entstehenden Pharynx stärker als auf der anderen Seite. Die Zellen, die zu einem endodermalen Schicksal determiniert sind, zeigen keine *NvWntA* Expression. Leider gibt es bislang keinerlei Expressionsdaten von *WntA* Orthologen anderer Organismen, die man mit der Expression in *N. vectensis* vergleichen könnte, um weitere Informationen über die Funktion oder die Konservierung der Funktion dieser Gruppe der *Wnt*-Liganden zu erhalten. *NvWntA* ist schon während der frühen Gastrulation exprimiert und markiert dort die frühesten Gastrulationsvorgänge. Hierbei findet man häufig zwei Einsenkungen des Ektoderms, die beide eine zirkuläre Expression aufweisen. Vermutlich steht die Funktion von *NvWntA* mit der Definition des Gastrulationspunktes und der Asymmetrie des Blastoporus in engem Zusammenhang. Auch die Effekte der Überexpression von *NvWntA* in *Xenopus* Embryonen könnten als Hinweise auf eine Rolle in der Gastrulation interpretiert werden. Die Überexpression scheint zu Störungen der Gastrulation des Frosches und damit der Keimblatttrennung zu führen. Die asymmetrische Expression von *NvWnt4* und *NvWntA* stützt die These der Existenz einer zweiten Körperachse, der „direktiven Achse“, mit einer definierten Polarität senkrecht zur Hauptkörperachse bei Cnidaria oder Anthozoa. Weitere molekulare Hinweise auf

die Existenz dieses zweiten Achsensystems liefert die ebenfalls asymmetrische Expression von Hox- und TGF $\beta$ -Genen (*BMP4/Dpp* und *GDF5*) (Ball et al, 2004; Salvini-Plawen und Splechtna, 1978; Finnerty et al, 2004; Finnerty, 2003). Mitglieder der BMP4 / Dpp Familie sind Antagonisten von Wnt-Liganden. Ein Ortholog dieser Genfamilie weist in *N. vectensis* neben einem Streifen im Endoderm des Tieres auch eine Expressionsdomäne im Ektoderm auf einer Seite des Blastoporus auf. Möglicherweise stehen die asymmetrischen Expressionsdomänen von *NvWnt4* und/oder *NvWntA* und BMP / Dpp in Zusammenhang und etablieren gemeinsam eine sekundäre Polarität des Tieres. Dieser Mechanismus initialisiert in der Frühentwicklung anderer Organismen die dorso-ventrale Musterbildung (Penton und Hoffmann, 1996; Yasui et al., 2001; Schneider und Mercola, 2001; Fischer et al., 2002; Lake and Kao, 2003).

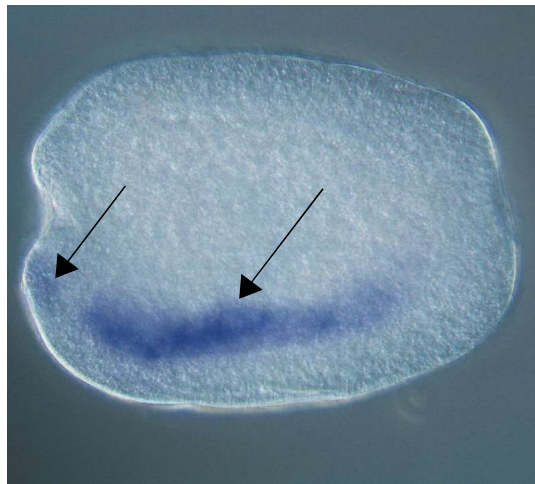


Abb.44: Asymmetrische Expression von *N. vectensis* BMP2/4 in einer 3 Tage alten Planularlarve.

Blastoporus links. Pfeile markieren die Expressionsdomänen.

#### 4.6.4 Wnt-Liganden mit einer Expression in bestimmten Zellpopulationen

Obwohl die kodierende Sequenz der beiden *NvWnt7* Paraloge ab der Aminosäureposition 152 sowohl auf Aminosäure- als auch auf Nukleinsäureebene identisch ist, zeigen beide fertigen Transkripte völlig verschiedene Expressionsmuster. Die Expression von *NvWnt7a* ist durch RT-PCR erst nach Abschluß der Gastrulation detektierbar. Zuerst ist dieses Transkript in der mittleren Planularlarve exprimiert. Dieser Zeitpunkt fällt mit dem ersten Auftauchen der Nesselzellen während der *N. vectensis* Individualentwicklung zusammen. Auch die Häufung von Zellen, in den sich entwickelnden Tentakeln die dieses Transkript exprimieren, spricht für die Theorie, daß dieses Transkript eine Funktion in der Spezifikation von Nesselzellen oder einem bestimmten Nesselzellensubtyp hat. Dies deckt sich gut mit der Rolle von Wnt-Liganden in der Spezifikation bestimmter neuronaler (Lee et al., 2004) und / oder Muskel-Zelltypen (Te und Reggiani, 2002). Die stark unterschiedliche Expression von *NvWnt7a* und *NvWnt7b* spricht gegen redundante Funktionen dieser beiden Genprodukte. Die Expression von *NvWnt10* zu Beginn der Mesenterienentwicklung spricht ebenfalls für eine Rolle in der Spezifikation eines bestimmten Zelltyps. Der Gastralraum von *N. vectensis* ist während des Planulastadiums mit Nährzellen vollständig ausgefüllt. In der frühen Planularlarve sind diese Zellen lichtmikroskopisch nicht voneinander unterscheidbar. Das erste sichtbare Anzeichen der Mesenterienentwicklung sind zwei Streifen von Zellen, die etwas kleiner und dichter als die sie umgebenden Zellen sind. Schon deutlich vorher sind die Mesenterienanlagen durch in-situ Hybridisierung mit einer *NvWnt10* spezifischen Sonde sichtbar zu machen.

Auch die Expression von *NvWnt11* ist auf bestimmte Zellen im sich entwickelnden Tier beschränkt. Wie in *Xenopus laevis* ist dieses Transkript schon maternal exprimiert und in den frühen Zellteilungsstadien auf bestimmte Blastomere beschränkt. Bei *Xenopus laevis* markiert dieser Bereich den Punkt, an dem sich das Nieuwkoop Zentrum etabliert, welches die Trennung der Keimblätter und somit das weitere Schicksal der Zellen, die durch den Blastoporus ins Innere des Embryos einwandern, bestimmt (Ku und Melton, 1993; Pandur et al., 2002). In den meisten bislang daraufhin untersuchten basalen Protostomiern und Deuterostomiern kann eine Wnt Expression an der Stelle, an der sich der

Blastoporus bilden wird, detektiert werden (Holland, 2002; Angerer und Angerer, 2003; Le Gouar et al., 2004). Die Fähigkeit von *NvWnt11*, in *Xenopus laevis* sowohl den gleichen Überexpressionseffekt wie das endogene Gen zu erzeugen als auch den durch Unterdrückung der Translation des Genes erzeugten Phänotyp zumindest teilweise zu retten, spricht dafür, daß die Wirkung von Wnt11-Subfamilienmitgliedern, wie auch die Sequenz selbst, im Verlaufe der Evolution konserviert blieb. Vermutlich dient *NvWnt11* dazu, den Punkt festzulegen, an dem sich im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung ein Organisationszentrum etabliert, das die Gastrulationsvorgänge und damit die Keimblatttrennung ebenso reguliert wie die Musterung entlang der entstehenden Körperachsen. Als weiterer Hinweis könnten die Injektionsexperimente mit dem endogenen *NvWnt11* in frühe Teilungsstadien von *N. vectensis* interpretiert werden. Die Überexpression verursachen ebenfalls Störungen der Gastrulation, die dazu führen, daß die Keimblatttrennung nicht vollständig gelingt und in der Folge die Ausbildung der Tentakel und anderer apikaler Strukturen, wie dem Blastoporus, beeinträchtigt wird.

#### 4.6.5 Wnt-Liganden mit unbekannter Expression

Die Expression der für Wnt-Liganden kodierenden Transkripte für *NvWnt8a*, *NvWnt3*, *NvWnt16* ist bislang unbekannt, diese Sequenzen wurden erst kürzlich identifiziert und die in situ Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen diese brachte bisher noch keine aussagekräftigen Ergebnisse.

#### 4.7 Konservierung der Funktion von Wnt-Liganden Subfamilien in der Evolution

Für die Injektionen in *Xenopus laevis* Eier wurden *NvWnt11* und *NvWntA* gewählt. Die frühe Expression von *NvWnt11* macht es wahrscheinlich, daß die Injektion in den frühen Embryo zu einem Zeitpunkt erfolgt, an dem auch das endogene Transkript aktiv ist. Zudem sind die Effekte der Injektion sowohl in *N. vectensis* als auch in *Xenopus laevis* möglicherweise vergleichbar. *NvWntA* wurde gewählt um Hinweise auf die unbekannte Funktion dieser Wnt-Subfamilie aus einem etablierten experimentellen System zu erhalten. Alle Injektionsexperimente in *Xenopus laevis* benötigen eine Vielzahl an Einzelexperimenten. Die Qualität der

Eier und damit die Überlebensfähigkeit der Embryonen von *Xenopus laevis* schwanken sehr stark. Die Sterberate in unbehandelten Kontrolltieren aus den verschiedenen Gelegen reichte von unter 1% bis über 80%. Daten aus Eigelegen mit einer Sterberaten der Kontrolltiere von über 30% wurden nicht in die Statistik miteinbezogen. In manchen Eigelegen waren im Vierzellstadium die Zellen, die den dorsalen Teil des späteren Tieres bildeten, sehr gut von den Zellen, aus denen der ventrale Bereich hervorging, zu unterscheiden. In anderen Gelegen war diese Unterscheidung kaum möglich. Im Normalfall sollen die Blastomere, die den dorsalen Teil des Tieres bilden, kleiner und weniger pigmentiert sein als die, aus denen der ventrale Teil hervorgeht. Unter der Annahme, daß die Blastomeren nicht voneinander zu unterscheiden sind, jedoch zum Erreichen eines bestimmten Effektes die korrekte Injektion in zwei bestimmte Blastomere der vier vorhandenen notwendig ist, ergeben sich statistisch 25% korrekt injizierte Individuen. In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Injektionsexperimenten wurden deutlich höhere Trefferquoten erreicht. Alle Injektionen wurden mit Eigelegen mehrerer Tiere durchgeführt, um auszuschließen, daß individuelle Unterschiede das Ergebnis beeinflussen.

Die beobachteten Phänotypen der Überexpressionsexperimente mit *NvWnt11* mRNA in *Xenopus laevis* entsprechen denen der Überexpression der endogenen mRNA. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß *NvWnt11* mRNA in der Lage ist, die gleichen Effekte wie die endogene mRNA zu erzeugen. Auch in den Kontrollexperimenten, bei denen *NvWnt11* mRNA in die ventralen Blastomeren injiziert wurden, gab es vereinzelt Gastrulationsdefekte. Diese sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf Injektion in mindestens ein falsches Blastomer zurückzuführen.

Die Injektion von gegen das endogene *XWnt11* Transkript gerichteten Morpholinos führt, wie auch die Überexpression des endogenen Gens, zu Störungen während der Gastrulation. Dieser Defekt ist optisch nicht von dem gegenteiligen Effekt zu unterscheiden. In beiden Fällen ist die konvergente Extensionsbewegung der Zellen gestört. Die Ko-Injektionsexperimente mit dem *XWnt11* Morpholino und der *NvWnt11* mRNA liefern Hinweise darauf, daß die mRNA aus *Nematostella* den durch das Morpholino erzeugten Defekt teilweise reduzieren kann. Sowohl der Anteil an toten Tieren als auch der Anteil der Tiere mit Gastrulationsstörungen wurde durch die Koinjektionen reduziert. Daraus lässt



sich vermuten, daß die Wirkung von Mitgliedern der Wnt11-Subfamilie im planaren Zellpolaritätssignalweg von den Ur-Eumetazoa bis zu den rezenten Mammalia konserviert blieb. Die Expression der Wnt-Liganden von *N. vectensis* weisen ebenfalls auf eine mögliche Konservierung der Funktion von Wnt-Liganden hin.

#### 4.8 Phylogenetische Position der Cnidaria

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten können darauf hinweisen, daß entweder der letzte gemeinsame Vorfahre von Cnidaria und Bilateria eine komplexere Genausstattung hatte als bisher vermutet (Kusserow et al., 2005; Ball et al., 2004) oder Cnidaria nicht so basal sind wie bisher angenommen. Da die genetische Ausstattung mit verschiedenen Wnt-Liganden erheblich komplexer ist, als es nach derzeitigen Vorstellungen für die Erzeugung eines morphologisch so einfachen Körperbaus wie dem von *N. vectensis* notwendig ist, könnte die Einfachheit des Körperbauplans dieses Tieres eine sekundäre Eigenschaft zu sein. Die Reduktion des Bauplanes von sessilen Organismen zur Radiärsymmetrie ist auch bei anderen Lebewesen wie den Pflanzen zu beobachten. Die Ausstattung an Wnt Genfamilien in Insekten und Nematoden ist geringer als bei Cnidaria. Dies lässt zwei Interpretationen zu. Zum einen können diese Genfamilien im Verlauf der Evolution vom letzten gemeinsamen Vorfahren der Cnidaria und der Ecdysozoa zu den rezenten Ecdysozoa verloren gegangen sein. Die Ecdysozoa könnten aber auch die basaleren Tiere sein. Viele Merkmale der Ecdysozoa sprechen für den umfangreichen Genverlust während der Evolution. So fehlen auch andere Gene in Ecdysozoa, die in einfacheren Organismen und Wirbeltieren vorhanden sind. Möglicherweise ermöglicht der Verlust von großen Genombereichen eine schnellere und energetisch effizientere Fortpflanzung durch schnellere Zellzyklen. Lange Zeit galten die Hydrozoen als die basale Gruppe innerhalb der Cnidaria, da ihr Körperbauplan der einfachste ist (keine Septen oder andere Verzweigungen im Gastralraum). Da aber viele Merkmale der Hydrozoen durch Anpassungen an die Lebensbedingungen erklärbar sind, ist es wahrscheinlich, daß diese Merkmale sekundär abgeleitet sind. Die Einteilung der Cnidaria an die Basis der Metazoenevolution beruht größtenteils auf ihrem auf den ersten Blick einfachen Körperbauplan mit einer

Symmetrieachse und zwei Keimblättern. Dieser Einfachheit im Körperbauplan steht jedoch eine überraschend komplexe Genetik gegenüber. Zudem besitzen Cnidaria mit den extrem spezialisierten Nesselzellen einen sehr hoch entwickelten Zelltyp. Das zentrale Argument der Einfachheit, die einzige Symmetrieachse, ist vermutlich auf eine sekundäre Reduktion aufgrund der sessilen Lebensweise der Polypen von Cnidaria zurückzuführen. Es erscheint fragwürdig, daß zunächst ein kompletter Satz an Genen entsteht, dem erst viel später eine Funktion zuwächst. Es ist viel wahrscheinlicher, daß die Diversifikation von Genen aus einem Vorläufergen und die Entstehung neuer Funktionen der Varianten einander gegenseitig bedingen. Die wahrscheinlichste Erklärung für die komplexe Ausstattung an Wnt-Genfamilien in *N. vectensis* ist die Evolution eines Bauplans mit mindestens zwei Achsensystemen bei dem letzten gemeinsamen Vorfahren von Cnidaria und Bilateria. Die zweite Symmetrieachse ging früh in der Evolution zu Cnidaria durch Reduktion dieser neuen Eigenschaften aufgrund der sessilen Lebensweise teilweise wieder verloren. In den phylogenetischen Berechnungen in dieser Arbeit fallen die Wnt-Sequenzen der Cnidaria oft an die Basis ihrer Subgruppe, was die These der basalen Organismengruppe unterstützt. Ist dies der Fall, war die genetische Ausstattung des letzten gemeinsamen Vorfahren von Cnidarian und Bilateriern erheblich komplexer als bislang vermutet.

#### 4.9 Evolution mehrzelliger Tiere

Die gängige Vorstellung für den Verlauf der frühen Evolution der Tiere basiert auf der Grundlage, daß Einfachheit des Körperbauplanes durch Einfachheit der genetischen Ausstattung bedingt wird und daher ein basales Merkmal darstellt. Nach dieser streng darwinistischen Vorstellung sind zwar auch sekundäre Reduktionen möglich (z.B. bei Ascidien), diese lassen sich aber bei genauerer morphologischer Untersuchung als solche identifizieren. Am Beispiel der Ascidien ist die Entwicklung der Larve mit einer Chorda dorsalis und der anschließenden Reduktion dieses und anderer Merkmale einer hohen Entwicklungsstufe einfach zu beobachten. Dies ist bei *N. vectensis* nicht der Fall. Dieser morphologisch einfache Organismus durchläuft eine einfache Individualentwicklung ohne sichtbare Merkmale komplexer Strukturen. Auch an deren Endpunkt steht ein einfacher Körperbau.

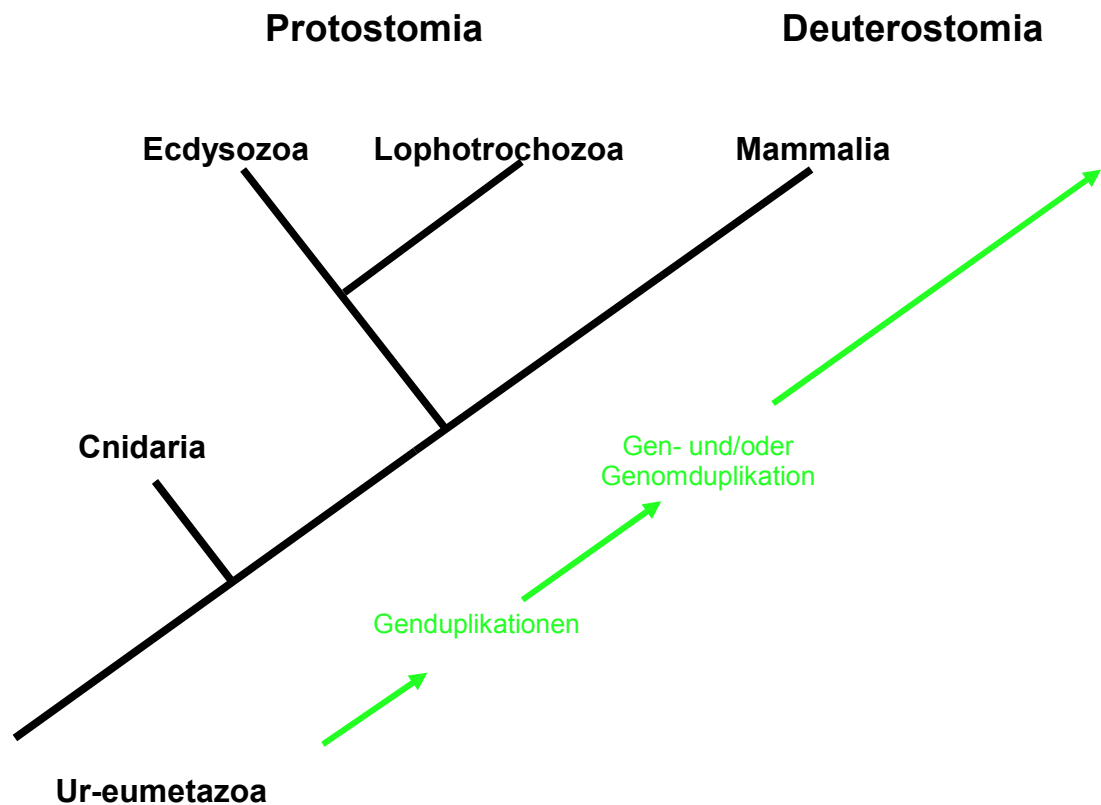


Abb.45: Schematische und vereinfachte Übersicht über die Ursache der wachsenden genetischen Komplexität im Verlaufe der Evolution nach darwinistischer Vorstellung.

Schwarze Linien symbolisieren den Stammbaum der Tiere. Grüne Pfeile den Ablauf mehrerer Gen- oder Genomduplikationen, die die genetische Ausstattung der Tiere, ausgehend von Ur-Eumetazoa, immer weiter vergrößert haben.

Die Ausstattung an Wnt-Subfamilien in *N. vectensis* ist jedoch viel komplexer als vorhergesagt (Ball et al., 2004). Während der Evolution vom letzten gemeinsamen Vorfahren von Protostomia und Deuterostomia zu den rezenten Hexapoda, sind im Falle der Wnt-Liganden mindestens zwei unabhängige Ereignisse des Genverlustes aufgetreten. An der Basis der Ecdysozoa-Evolution sind die Gruppen Wnt3, -4, -8, und 11 verloren gegangen. In der weiteren Evolution der Insekten die Subgruppen Wnt2 und Wnt16. Während der Evolution der Nematoden gingen zudem noch die Subfamilien WntA und Wnt10 verloren.

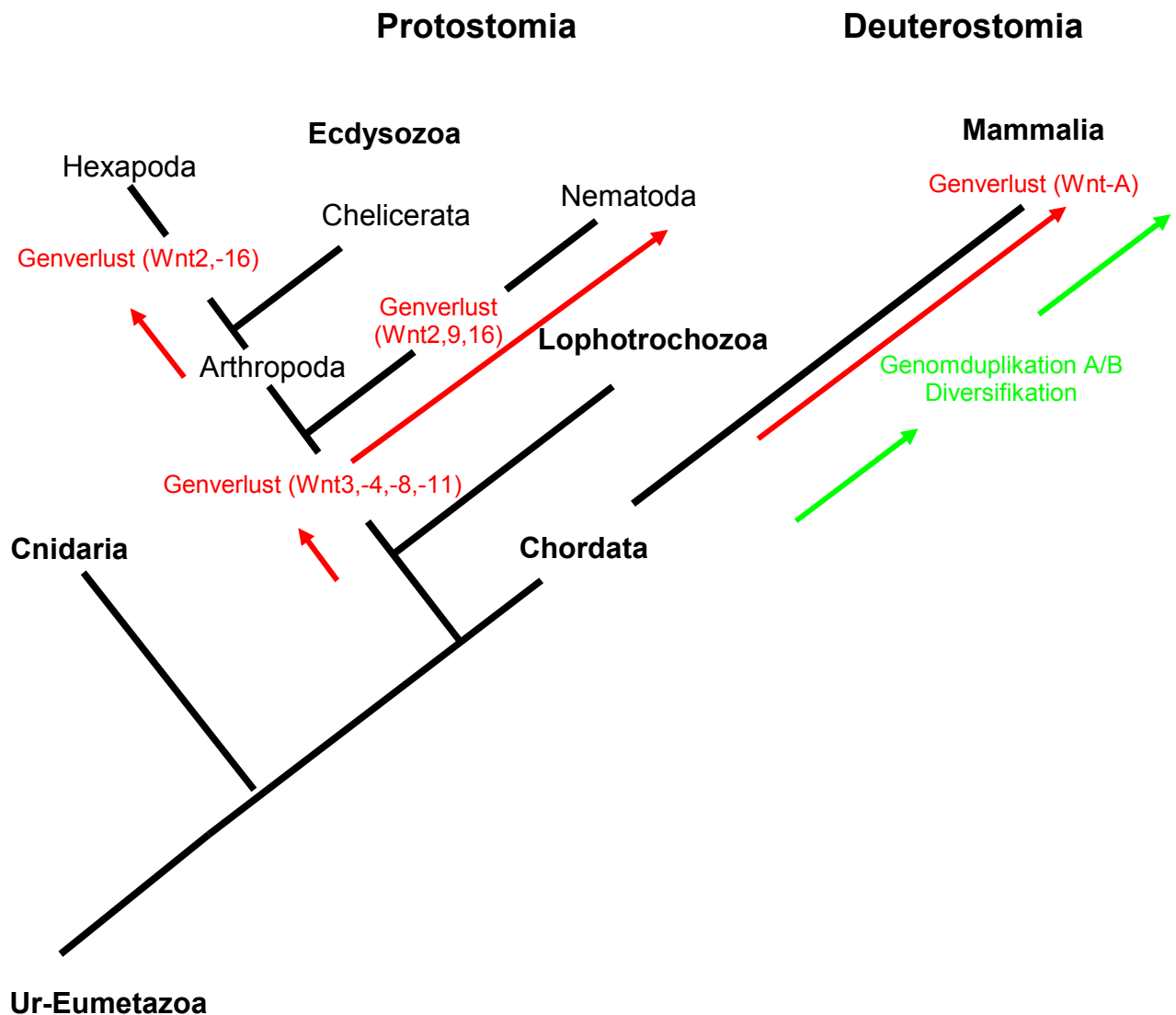


Abb.46: Übersicht über Verlust und Neuerwerb von Wnt-Genen im Verlauf der Evolution. Schwarze Linien symbolisieren den Stammbaum der Tiere. Grüne Pfeile Genoder Genomduplikationen. Rote Pfeile den Verlust von Genen. Die verlorenen Gene sind in roter Schrift aufgeführt.

Vermutlich fanden große Umstrukturierungen mit Verlusten an genetischem Material innerhalb der Genome der Protostomier statt. Auch in der Evolution der Chordata ging ein Wnt Gen verloren. Dieser Verlust muß spät in der Evolution stattgefunden haben, denn die WntA Subfamilie war an der Basis der Chordatenentwicklung (*Ciona intestinalis*) noch vorhanden. Vermutlich steht auch dieser Verlust mit größeren Umstrukturierungen des Genoms in Zusammenhang, die an der Basis der Vertebraten-Evolution stattgefunden haben.

Viele Eigenschaften der Genome der Protostomia und der Deuterostomia sind deutlich verschieden. So weicht zum Beispiel die Intron-Exon Struktur der Wnt- und vieler anderer Gene von *Drosophila melanogaster* und von *Caenorhabditis elegans* deutlich von der bei Vertebraten ab (Kusserow, 2001). Auch die unterschiedliche chromosomale Anordnung der Wnt-Gene spricht für umfangreiche Reorganisationsereignisse und Genverluste, die möglicherweise mit der Evolution der segmentalen Organisation der Arthropoden in engem Zusammenhang steht. Eine segmentale Organisation des Körperbauplanes ist mit einer wesentlich kleineren Ausstattung an Signalen realisierbar, die sich in jedem Segment wiederholt. Dagegen müssen für die kontinuierliche Musterung einer Körpersäule unterschiedliche Signale der Regionalisierung über größere Distanz hintereinander geschaltet sein.

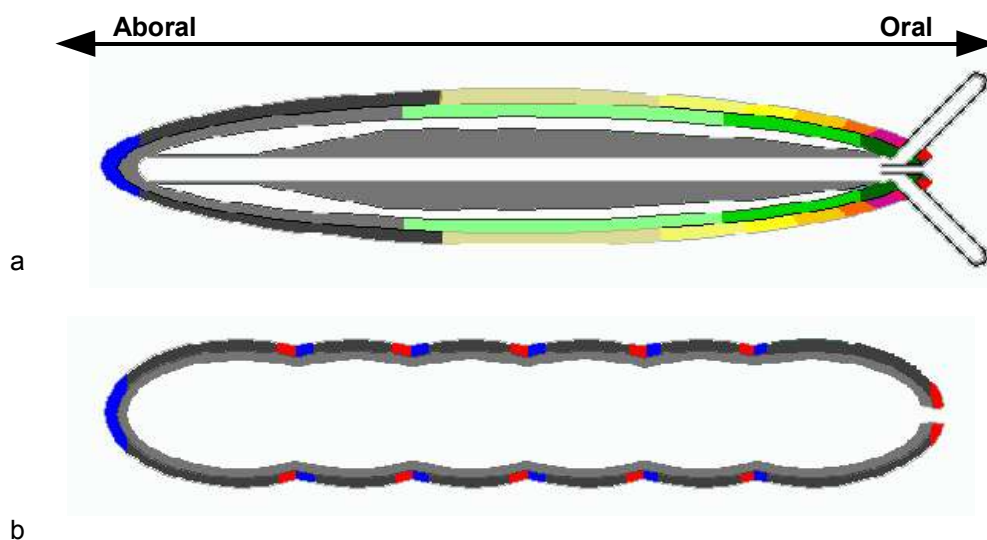


Abb.47: Schematische Übersicht über eine mögliche Evolution durch Generwerb und Genverlust.

a) Vereinfachte gestaffelte Anordnung der Wnt Genexpression entlang der Hauptkörperachse von *N. vectensis*. Ektodermale Gene in Rot- und Gelbtönen, endodermale Gene in Grünschattierungen. Hypothetischer Antagonist (z.B. Engrailed) in blau.

b) Vereinfachte schematische Anordnung von wingless Expressionsdomänen (rot) entlang der Hauptkörperachse von *Drosophila melanogaster* (Wolpert, 1999) und *Platynereis dumerilii* (Prud'homme et al., 2003) engrailed Expression in blau.

Die Hypothese eines großen genetischen Reorganisationsereignisses an der Basis der Ecdysozoa-Evolution rückt diese als abgeleitete Organismengruppe von der Evolution der Deuterostomier und anderer Protostomier ab. Die Sequenzierung des gesamten Genoms von *N. vectensis* ist weit vorangeschritten und die Anordnung der Gene auf den Chromosomen wird Beiträge zur Aufklärung des evolutionäre Ursprungs der Wnt-Genfamilie und der Evolution insgesamt leisten. Weitere Klarheit über den Verlauf der Evolution kann gewonnen werden, wenn weitere Genome von basalen Metazoen sequenziert werden. Besonders geeignet wären die Genome von Porifera, Plathelminthes und basalen Lophotrochozoa. Leider stehen relativ wenig Erkenntnisse aus diesen Gruppen einer Fülle an Daten aus Ecdysozoa gegenüber, was Fehlinterpretationen über den Verlauf der Evolution zu höheren Tieren fördert. So wurde nach Veröffentlichung der menschlichen Genomsequenz als große Erkenntnis dieses Projektes geschlossen, daß viele Gene durch horizontalen Gentransfer von Bakterien auf den Menschen übertragen wurden (Lander et al., 2001). Diese Gene wurden sowohl im Menschen, wie auch in den Genomen vieler Bakterien identifiziert, fehlten aber in den Genomen von Ecdysozoa.

Insgesamt scheint die Anzahl an Genen, die in einem Genom vorhanden sind, in keinem direkten Zusammenhang mit der morphologischen Komplexität eines Organismus zu stehen. Morphologisch einfache Tiere wie *N. vectensis* können sehr komplexe Genome besitzen, während Tiere mit komplexen morphologischen Merkmalen wie *Anopheles gambiae* vergleichsweise einfache Genome haben können. Zudem scheint der Verlust von Genen, ebenso wie Neuerwerb durch Duplikationen, zur Evolution von Körperbauplänen beitragen zu können. Vermutlich war die Voraussetzung für den evolutionären Sprung von der Einzelligkeit zur Vielzelligkeit ein komplexes Netzwerk an miteinander interagierenden Signalkaskaden. Diese führten zur Etablierung eines Signalzentrums, das die komplexen Vorgänge der Gastrulation mit der Entstehung verschiedener Keimblätter durch Invagination und Ingression des äusseren Epithels reguliert. Diese komplexe molekulare Maschinerie ermöglichte daraufhin die schnelle Entstehung von komplexeren Körperbauplänen. Die Erweiterung der Ausstattung an Transkriptionsfaktoren wie der Hox-Gene der Chordaten (Holland und Garcia-Fernandez, 1996) oder der MADS box Gene der Pflanzen (Ng und Yanofsky, 2001) steht möglicherweise in Verbindung mit dem Anstieg der

morphologischen Komplexität im Verlauf der kambrischen Explosion und der weiteren Evolution bis hin zum Menschen.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

#### 5.1.1 Herkunft der verwendeten Tiere

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Spezies *N.vectensis* (Stephenson 1935) gehört der basalen Gruppe der Cnidaria, den Anthozoa an. Die genaue taxonomische Klassifizierung lautet: Stamm: Cnidaria; Klasse: Anthozoa; Unterklasse: Hexacorallia; Ordnung: Actinaria; Subordnung: Nyantheae; Tribus: Athenaria; Familie: Edwardsiidae; Gattung: Nematostella; Spezies: *N. vectensis*. Die in Darmstadt kultivierten Tiere entstammen einer Sammlung in Rhode River, Maryland (Hand und Uhlinger, 1992). Sie sind Nachkommen einer Kreuzung der Linien CH2 und CH6 aus dem Labor von Cadet Hand.

#### 5.1.2 Kultur von *N. vectensis*

Adulte Tiere wurden bei 18°C in artifiziellen Brackwasser mit einer Salinität (Tropic marine) von 1,35 ‰ und pH 7,8, getrennt nach den Geschlechtern, im Dunkeln kultiviert. Die Tiere wurden 3 X pro Woche mit frisch geschlüpften Naupliuslarven (*Artemia salina*) gefüttert. Einmal pro Woche wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Vermehrung der Tiere kann sowohl geschlechtlich, wie auch ungeschlechtlich durch Teilung erfolgen. Für die Vermehrung der Kultur wurden die Tiere durch einen Schnitt durch die Körpersäule unterhalb der Mesenterien geteilt. Die obere Hälften der so behandelten Tiere regenerierten innerhalb von zwei Tagen vollständig. Die unteren Abschnitte bildeten innerhalb einer Woche neue Tentakel aus.

#### 5.1.3 Induktion der Gametogenese

Die adulten Tiere beider Geschlechter wurden durch 13h Lichtbestrahlung mit einer Lampe des Typs FC8T9.CW, Radium, 22 W/25°C (General Electric) und einer Temperaturerhöhung auf 25°C zur Gametenabgabe induziert. Die gewonnen Eier wurden jeweils gleichzeitig befruchtet, indem die abgelegten Eipakete in ein



Kulturgefäß mit Männchen und deren Spermien überführt wurden (Fritzenwanker und Technau, 2002).

#### 5.1.4 Entnahme von Embryonen

Die Embryonen wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Fertilisation, in bestimmten Entwicklungsstadien, für die Experimente entnommen. Embryonen, von der Zygote bis zum Erreichen des Planulastadiums, wurden durch 3%ige L-Cysteinlösung (pH 7,8) in Nematostellamedium ca.15 min. aus der sie umgebenden Gallerte herausgelöst (Scholz und Technau, 2001).

<b>Entnahmezeitpunkt in Stunden (h) oder Tagen (d) nach Fertilisation</b>	<b>Erreichtes Entwicklungsstadium</b>
- 0,5 h	Unbefruchtete reife Eier
+ 3 h	4 Zellen
+ 4 h	8 Zellen
+ 5 h	16 Zellen
+ 6 h	32 Zellen
+ 7 h	64 Zellen
+ 8 h	Morula
+ 12 h	frühe Blastula
+ 16 h	Späte Blastula
+ 1 d	Frühe Gastrula
+ 2,5 d	Mittlere Gastrula
+ 2 d	Späte Gastrula
+ 3 d	frühe Planularlarve
+ 4 d	mittlere Planularlarve
+ 5 d	späte Planularlarve
+ 6 d	Metamorphosestadium
+ 7d	Frühe Primärpolypen
+ 8-12 d	Primärpolypen
> 90 d	Adulte

Tab.3: Übersicht über die Entnahmenzeitpunkte von Embryonen für die Fixierung und die cDNA Synthese.

1. Spalte) Entnahmezeitpunkt in Stunden (h) oder Tagen (d) nach der Befruchtung.
2. Spalte) Bis zu diesem Zeitpunkt erreichtes Entwicklungsstadium.

## 5.2 Isolation von RNA

### 5.2.1 Lysis der Tiere

Es wurden für jede RNA-Präparation 0,1 g Gewebe in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Embryonen wurden vollständig in 500 µl GTC-Lysispuffer (4 M GTC [Guanidinthiocyanat], 25 mM Natriumcitrat [pH 7], 0,5% Sarcosyl, 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) durch mehrmaliges schnelles Auf und Abpipettieren lysiert. Adulte *N. vectensis* wurden unter ständigen Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser zermahlen, das gefrorene Mahlgut wurde in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und sofort mit GTC-Lysispuffer versetzt.

### 5.2.2 RNA Isolation

Zu jeweils 500µl lysiertem Gewebe wurde zur Ansäuerung 50 µl Natriumacetat (2 M, pH 4) gegeben. Anschließend wurden 550 µl eines Gemischs von Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) zugeben. Die RNA wurde unter schütteln in der wässrigen Phase gelöst. Nach 15 min Kühlung auf Eis wurde das Gemisch bei 4°C zentrifugiert (15 min. bei 12000 g). Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Natriumchlorid (1,2 M), 200 µl Isopropanol (100%) und 200 µl Natriumcitrat (0,8 M) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein weiteres mal unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment 3 X mit Ethanol (75%) gewaschen , in 20 µl DEPC H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

## 5.3 Herstellung von cDNA

Je nach Verwendungszweck wurden unterschiedliche Methoden der cDNA Synthese gewählt.

### 5.3.1 Herstellung von cDNA zum Komplettieren eines Genfragmentes in 5'-Richtung

Für die Herstellung von 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) cDNA (copy DNA), wurden die Produkte der RNA-Isolationen aus mehreren Entwicklungsstadien von *N. vectensis* zu gleichen Volumenteilen gemischt und als Matrize für die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Für die Verwendung als Matrize für 5'-RACE PCR (Polymerase Chain Reaction) Reaktionen wurde die cDNA mit dem GeneRacer System nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) synthetisiert. Zum Start der reversen Transkriptionsreaktion wurden die im GeneRacer System mitgelieferten Oligonukleotide (Primer) verwendet (Generacer oligo dT Primer 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub>-3'). Das GeneRacer System verhindert, daß unvollständige mRNA Fragmente in cDNA transkribiert werden. Hierfür werden enzymatisch die freien Phosphatgruppen der mRNA-Fragmente entfernt. Anschließend wird die am 5'-Ende von vollständigen Transkripten liegende Cap-Struktur entfernt. Bei dieser Reaktion verbleibt eine reaktionsfähige Phosphatgruppe am 5'-Ende der mRNA. Diese wird in der folgenden Ligationsreaktion für die Anheftung eines im Generacer System mitgelieferten RNA-Oligonukleotids genutzt (Generacer RNA Oligonukleotid :5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'). Diese Sequenz dient in den 5'-RACE PCR-Reaktionen als Anlagerungsstelle für die mitgelieferten DNA-Primer.

### 5.3.2 Herstellung von cDNA zum Komplettieren eines Genfragmentes in 3'-Richtung

Die RNA Isolationen verschiedener *N. vectensis* Entwicklungsstadien wurden jeweils getrennt als Matrizen für die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Die 3'-RACE cDNA Synthese wurden nach Frohmann (1995) mit der reversen Transkriptase „Superscript II“ nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Hierbei ist der oligo dT Primer für die reverse Transkription am 5'-Ende um 36 Basen mit bekannter Sequenz verlängert (Primer QT: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC(T)<sub>17</sub>-3'). Diese Sequenz dient als Anlagerungspunkt für die 3'-Primer in der nachfolgenden 3'-RACE PCR. Die

Produkte dieser cDNA-Synthesereaktionen wurden auch als Matrize für RT-PCR Reaktionen zur Transkriptdetektion in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *N. vectensis*, im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet.

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit waren Transkriptfragmente von sechs verschiedenen Wnt-Liganden aus der Diplomarbeit von Karsten Sturm (Sturm, 2000) vorhanden.

Primer	Sequenz
NvWnt1deg	5' -TGG (GC) A (ACGT) TGGGG (ACGT) GG (ACGT) TG-3'
NvWnt3deg	5' -CC (ACGT) GC (ACGT) (CT) (CGT) (AG) TT (AG) TG-3'
NvWnt5deg	5' -T (CT) (ACGT) CC (AG) TG (AG) CA (CT) TT (AG) CA-3'

Tab.4:degenerierte Primer zur Klonierung von Wnt-Homologen aus *N. vectensis*.

Die Sequenz der für die Identifikation von Wnt-Transkriptfragmenten verwendeten Primer.

In Klammern sind jeweils die im Primergemisch an dieser Position vorhandenen Nukleotide angegeben (Degeneration).

Die degenerierten Primer wurden nach folgendem Schema in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt: In beiden Reaktionen war NvWnt1deg der 5'-Primer, in der ersten Reaktion war NvWnt5deg der 3'-Primer und in der zweiten war NvWnt3deg der 3'-Primer (nested Primer)

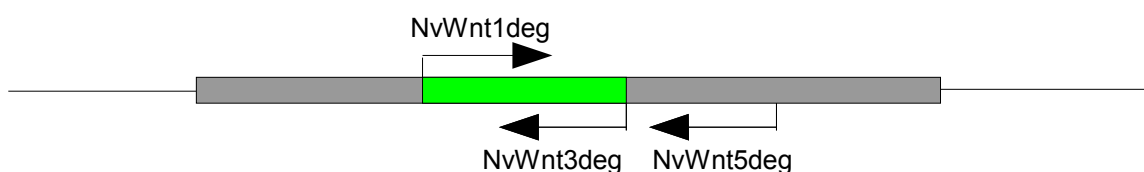


Abb.48: Übersicht über das Schema der Wnt-Transkriptidentifikation durch degenerierte Primer. Horizontale Linien zeigen 5'- und 3'-untranslatierte Transkriptbereiche. Der graue horizontale Balken symbolisiert den kodierenden Bereich, die horizontalen Pfeile die relative Lage der Primerbindungsstellen und die Richtung, in der das 3'-Ende des Primers bei der Bindung an das Zieltranskript weist. Der grüne Bereich markiert den Transkriptbereich, der zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannt war.

## 5.4 Durchführung von PCR-Reaktionen zur Komplettierung von cDNA-Fragmenten

### 5.4.1 5'-RACE

Für die Amplifikation unbekannter 5'-Transkriptbereiche wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen durchgeführt. Als Matrize wurde die unter Verwendung des GeneRacer Systems synthetisierte 5'-RACE cDNA eingesetzt. 1 µl des Produkts der zuerst durchgeführten PCR-Reaktion, diente als Matrize für die zweite PCR-Reaktion. Die Bindungsstellen für die Primer der zweiten Reaktion lagen jeweils etwas innerhalb des durch die erste Reaktion amplifizierten Transkriptbereiches. Als 5'-Primer für diese PCR-Reaktion wurden jeweils die im GeneRacer System mitgelieferten DNA-Oligonukleotide eingesetzt:

5'-Primer 1. Reaktion:

GeneRacer 5' Primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

5'-Primer 2. Reaktion:

GeneRacer 5' Nested Primer 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3').

Als 3'-Primer wurden für jedes untersuchte Gen spezifische Primer verwendet, die revers komplementär zum schon bekannten Transkriptbereich (Sturm, 2000) der Wnt-Gene waren:

3'-Primer 1. Reaktion:

NvWnt1-5'-RACE-a 5'-GAAATCCCGTCCTTTTTCTTGTGC-3'

NvWnt4-5'-RACE-a 5'-GGACTGCCAATCCCGCTTCCACGC-3'

NvWnt7a-5'-RACE-a 5'-GAGCTTTTATAGAGCCCGT-3'

NvWnt8a-5'-RACE-a 5'-CACACGCGCAATTCCTAAA-3'

NvWnt10-5'-RACE-a 5'-GGAGTGTAATCTCGTCCTTTCTCG-3'

NvWnt11-5'-RACE-a 5'-CCTCATGCGCTGAGCTTCCACCGC-3'

NvWntA-5'-RACE-a 5'-GGTATTCCAATTCTTTGCGCGGCG-3'

3'-Primer 2. Reaktion:

NvWnt1-5'-RACE-i 5'-CAAAGCGCTTTGAAAAGTTGTCTGC-3'

NvWnt4-5'-RACE-i 5'-GTGGCAAAGGTCATGCCGAAGTCG-3'

NvWnt7a-5'-RACE-i 5'-CGTTCTGCACGGAGAATG-3'

NvWnt8a-5'-RACE-i 5'-AAGAAATACGTGACGGCTGC-3'

NvWnt10-5'-RACE-i 5'-GCGAGTCCAAAAATTTGGCAGACG-3'

NvWnt11-5'-RACE-i 5'-CGTCCGTGAAGTCTTTGCTAAAGC-3'

NvWntA-5'-RACE-i 5'-CATGAATTTGCGTGAGAAATCGTCC-3'

Alle Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Es wurde in jeder Reaktion jeweils 1 µl cDNA-Lösung eingesetzt. Für jedes Gen wurden drei Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt direkt aus der cDNA Synthese, 1:10 verdünnt und 1:100 verdünnt) durchgeführt. Weiterhin wurden jedem Reaktionsansatz 5 µl 10-fach konzentrierter Polymerasepuffer (250mM / µl) des Herstellers (Amersham), 0,5 µl des 5'-Primers (50 pM/µl), 0,5 µl des 3'-Primers (50 pM/µl), 1 µl dNTP-Mischung (12,5 mM pro Nukleotid) sowie 0,3 µl einer DNA abhängigen DNA-Polymerase (Amersham Taq) zugesetzt. Zuerst wurde jeder Reaktionsansatz 5 min bei 95°C denaturiert, dann folgten 30 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 95°C für 1 min, einer Primerbindungstemperatur von 55°C für 1 min und einer Elongationstemperatur von 72°C für 3 min. Nach Abschluß der Zyklen wurden die Einzelstrangüberhänge im Reaktionsansatz durch eine 5 min Inkubation bei 72°C aufgefüllt. Geling es mit diesen Reaktionsbedingungen nicht ein DNA-Fragment zu amplifizieren, wurde die Reaktion mit dem gleichen Reaktionsansatz aber variierten Primerbindungstemperaturen (Gradient von 45-65°C) wiederholt.

#### 5.4.2 3'-RACE

Für die Amplifikation unbekannter 3'-Bereiche wurde ebenso wie bei der Amplifikation von unbekannten 5'-Transkriptbereichen verfahren. Hier war die Sequenz der 5'-Primer identisch mit Abschnitten aus dem bekannten Transkriptbereich (Sturm, 2000):

5'-Primer 1. Reaktion:

NvWnt1-3'-RACE-a 5'-CAGACAACCTTTTCAAAGCGC-3'

NvWnt4-3'-RACE-a 5'-TGCCACGCGATTCGTGGACG-3'

NvWnt7a-3'-RACE-a 5'-ATATTGGCCACGGCTTGGCG-3'

NvWnt8a-3'-RACE-a 5'-CCAAACACTTCCTAAACGCC-3'

NvWnt10-3'-RACE-a 5'-ACGGCATTGAAACGTCTGCC-3'

NvWnt11-3'-RACE-a 5'-ACATAGCTCGGGGCATGCGC-3'

NvWntA-3'-RACE-a 5'-CGAAAACGTGGGGCATGGGG-3'

5'-Primer 2.Reaktion:

NvWnt1-3'-RACE-i 5'-CGCACAAGAAAAAGGACGGG-3'

NvWnt4-3'RACE-i 5'-GCGTGGAAGCGGGATTGGCAGTCC-3'

NvWnt7a-3'-RACE-i 5'-GGTCAGGAGCGATATAGCCC-3'

NvWnt8a-3'-RACE-i 5'-ACTTCCTTCCCGTGTGTTTG-3

NvWnt10-3'-RACE-i 5'-CTCGCGCGAGAAAGGACGAG-3'

NvWnt11-3'-RACE-i 5'-CAAAGACTTCACGGACGCGG-3'

NvWntA-3'-RACE-i 5'-TGGACCCAGAGCCGCCGCGC-3'

#### 5.4.3 PCR zur Erzeugung vollständiger kodierender Transkriptbereiche

Es wurden aus den durch 5'- und 3'-RACE Experimenten identifizierten Transkriptsequenzen Primer abgeleitet, mit denen sich der gesamte kodierende Bereich der Transkripte amplifizieren ließ. Als Matrize wurden je 1 µl eines Gemischs stadienspezifischer 3'-RACE cDNA verwendet. Die Primer wurden so gewählt, daß die inneren 5'- und 3' Primer in Ihrer Sequenz das Startkodon (ATG) und das Stopkodon (TAA) beinhalteten oder diese Kodone in der amplifizierten Sequenz enthalten waren:

5'-Primer 1. Reaktion:

NvWnt1-ORF-5'-a 5'-GAAAGACGCAAACGCATAAGTG-3'

NvWnt4-ORF-5'-a 5'-CAGTGTTTGCTGTTACAG-3'

NvWnt7a-ORF-5'-a 5'-CATTCTCCGTGCAGAACG-3'

NvWnt10-ORF-5'-a 5'-GTAAGACGCTTCAAGTTATG-3'

NvWnt11-ORF-5'-a 5'-GATCAGTAAAGCAGGGAG-3'

WntA-ORF-5'-a 5'-GGACACTGACATGGACTG-3'

3'-Primer 1.Reaktion:

NvWnt1-ORF-3'-a 5'-GCAGACCATGCAACGATTCAGC-3'

NvWnt4-ORF-3'-a 5'-TTGAATCTCTCATCGACG-3'

NvWnt7a-ORF-3'-a 5'-TTTCACGCTTGGAGGACA-3'

NvWnt10-ORF-3'-a 5'-CGATAGCGAGTTTCCTAC-3'

NvWnt11-ORF-3'-a 5'-CAACAAAGATACGCACAGCT-3'

NvWntA-ORF-3'-a 5'-GAGATGGCTGTCTCCGTTGC-3'

5'-Primer 2. Reaktion:

NvWnt1-ORF-5'-i 5'-GCAGACCATGCAACGATTCAGC-3'

NvWnt4-ORF-5'-i 5'-GTTCAATAATGATCGCAC-3'

NvWnt7a-ORF-5'-i 5'-ACGGGCTCTAAAAAGCTC-3'

NvWnt10-ORF-5'-i 5'-CGATAGCGAGTTTCCTAC-3'

NvWnt11-ORF-5'-i 5'-GATGTACTCTTTGTTTGGC-3'

NvWntA-ORF-5'-i 5'-GAGATGGCTGTCTCCGTTGC-3'

3'-Primer 2. Reaktion:

NvWnt1-ORF-3'-i 5'-GATCATTAAAGTAACTGCTTA-3'

NvWnt4-ORF-3'-i 5'-GATATTTGGTGGTTATTTGC-3'

NvWnt7a-ORF-3'-i 5'-CTATTTGCACGTCTGGACA-3'

NvWnt10-ORF-3'-i 5'-GGCTGGGGTGGCACTACATC-3'

NvWnt11-ORF-3'-i 5'-TGTGGCAGTAGTTAGGCGA-3'

NvWntA-ORF-3'-i 5'-GAGATGGCTGTCTCCGTTGC-3')

Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie bei den 5'- und 3'-RACE PCR Reaktionen.

## 5.5 Ligation, Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung

Alle durch PCR-Reaktionen hergestellten DNA-Fragmente wurden direkt in den TA-Klonierungsvektor pGEM-T nach den Angaben des Herstellers (Promega) ligiert. Ligierte Plasmide wurden durch einen Hitzeschock (42°C für 45 s.) in Bakterien (XL1-Blue) eingebracht (Hanahan et al., 1977). Die transformierten Bakterien wurden durch Blau-Weiss-Selektion identifiziert und in 4 ml Flüssigkultur vermehrt. Die Isolation der Plasmide wurde mit dem Plasmidpräparationssystem „Nucleo spin“ nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) durchgeführt. Durch Restriktion mit den Enzymen Apal und SacI wurde die Größe der Plasmidinsertionen bestimmt. Die in den Vektor ligierten DNA-Fragmente richtiger Größe wurden zur Sequenzierung eingeschickt ( Fa. GATC).



## 5.6 Alignierung von Aminosäuresequenzen

Für die Erstellung des Alignments wurden die DNA Sequenzen der durch PCR amplifizierten *N.vectensis* Transkripte in die korrespondierende Aminosäuresequenz übersetzt. Weitere Wnt-Aminosäuresequenzdaten aus *N.vectensis* wurden von Marc Q. Martindale (Kewalo Marine Lab PBRC, University of Hawaii) zur Verfügung gestellt. Weitere Aminosäuresequenzen von Wnt-Liganden aus verschiedenen Spezies wurden in der NCBI Genbank identifiziert und ebenfalls für das Alignment genutzt. Das Alignment sollte Sequenzen aller bekannten Wnt-Subfamilien aus mehreren Tiergruppen (Cnidaria, Lophotrochozoa, Insecta, Vertebrata) enthalten. Folgende Sequenzen wurden für die Erstellung des Alignments verwendet.

Subfamilie	Name	Synonym	GenBanknr	Spezies	Representierte Gruppe
Wnt1	<i>AgWnt1</i>		EAA14180	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	<i>BfWnt1</i>		AF061974	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	<i>BmWnt1</i>		D14169	<i>Bombyx moori</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	<i>HsWnt1</i>		AAH74840	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>NvWnt1</i>		AY530300	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	<i>PdWnt1</i>		AJ491796	<i>Platynereis dumerili</i>	Polychaet(Lophotrochozoa)
Wnt2	<i>HsWnt2A</i>		NM003391	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>HsWnt2B</i>	HsWnt13	NM024494	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>NvWnt2</i>		AY725201	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	<i>PvWnt2</i>		AJ491797	<i>Patella vulgata</i>	Mollusk (Lophotrochozoa)
Wnt3	<i>BfWnt3</i>		AF361013	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	<i>HsWnt3A</i>		NM033131	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>HsWnt3</i>		NM030753	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>HvWnt3</i>		AF272673	<i>Hydra vulgaris</i>	Hydrozoo (Cnidaria)
Wnt4	<i>BfWnt4</i>		AF061973	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	<i>HsWnt4</i>		NM030761	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>NvWnt4</i>		AY687348	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	<i>PdWnt4</i>		AJ491798	<i>Platynereis dumerilii</i>	Polychaet (Lophotrochozoa)

Subfamilie	Name	Synonym	GenBanknr	Spezies	Representierte Gruppe
Wnt5	AgWnt5		XP319487	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	BfWnt5		AF361014	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	CeWnt5	CeWnt2	Z68301	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematod (Ecdysozoa)
	HsWnt5A		NM003392	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	HsWnt5B		NM030775	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	NvWnt5		AY725202	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
Wnt6	AgWnt6		XP318816	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	DmWnt6		AE003617	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	HsWnt6		NM006522	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	NvWnt6		AY725203	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
Wnt7	BfWnt7B		AF061975	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	DmWnt7	DmWnt2	AE003833	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	HsWnt7A		NM004625	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	HsWnt7B		NM058238	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	NvWnt7a		AY687348	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	NvWnt7b		AY725204	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
Wnt8	BfWnt8		AF190470	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)
	HsWnt8A		NM031933	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	HsWnt8B		NM003393	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	NvWnt8a		AY792510	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	NvWnt8b		AY725205	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
Wnt9	AgWnt9		XP318818	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	HsWnt9A	HsWnt14	NM003395	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	HsWnt9B	HsWnt15	AY358217	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
Wnt10	AgWnt10		EAA14172	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	HsWnt10A		BC052234	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	HsWnt10B		NM003394	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	NvWnt10		AY530301	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
Wnt11	BfWnt11		AF187553	<i>Branchiostoma floridae</i>	Chordat (Deuterostomia)

Subfamilie	Name	Synonym	GenBanknr	Spezies	Representierte Gruppe
	<i>HsWnt11</i>		NM004626	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)
	<i>NvWnt11</i>		AY687349	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
WntA	<i>AgWntA</i>		XP314777	<i>Anopheles gambiae</i>	Insekt (Ecdysozoa)
	<i>NvWntA</i>		AY534532	<i>N. vectensis</i>	Seeanemone (Cnidaria)
	<i>PdWntA</i>		AJ491801	<i>Platynereis dumerilii</i>	Polychaet (Lophotrochozoa)
	<i>PvWntA</i>		AJ491805	<i>Patella vulgata</i>	Mollusk (Lophotrochozoa)
Wnt16	<i>HsWnt16</i>		NM057168	<i>Homo sapiens</i>	Vertebrat (Deuterostomia)

Tab.5: Übersicht über die in Stammbaumberechnungen verwendeten Aminosäuresequenzen. Alle verwendeten Sequenzen werden mit ihrer Subguppenzugehörigkeit, dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Namen, der Bezeichnung des Genbankeintrages, der Herkunftsspezies sowie einer übergeordneten Taxonomischen Bezeichnung aufgeführt. Tabelle: Kusserow et al., 2005.

Die aminoterminalen Bereiche jeder Wnt-Sequenz wurden bis eine Aminosäure vor der ersten konservierten Cysteinposition aus jeder Aminosäuresequenz gelöscht. Diese Sequenzen wurden mithilfe des Programmes ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) aligniert. Es wurden die Grundeinstellung dieses Programmes benutzt. Als Ausgabeformat wurde GCG MSF als Dateiformat gewählt. Das resultierende Alignment wurde in das Programm GENEDOC (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>) importiert und anschließend manuell überarbeitet. Als Richtlinie für die Nachbearbeitung wurden konservierte Sequenzmotive verwendet die durch das Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) identifiziert wurden. Es wurden zusätzliche Alignments erstellt, die jeweils nur die Sequenzen einer der Wnt-Subfamilien enthielten um Sequenzmotive zu identifizieren, die nur in einzelnen der Subfamilien vorhanden sind. Diese Informationen wurden ebenfalls für die manuelle Bearbeitung des Alignments herangezogen.

## 5.7 Berechnung molekularer Stammbäume

Das erstellte Alignment wurde im Phylip Dateiformat für die Verwendung in den Programmen TreePuzzle (Strimmer, v. Haeseler, 1996; Schmidt, 2002) (<http://www.tree-puzzle.de/>) und PAUP (<http://paup.csit.fsu.edu/>) und im

Dateiformat MSF GCG für die Verwendung im Programm MrBayes (Huelsenbeck, 2001) (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes>) aus GENEDOC exportiert. Für die Berechnung molekularer Stammbäume wurden im Programm TreePuzzle folgende Einstellungen vorgenommen: Number of Puzzling steps=25000, Display as outgroup=*HsWnt9*, Parameter estimates=Exact (slow) Parameter estimation uses=Quartet sampling+Neighbor-joining tree, Model of Substitution=JTT (Jones et al., 1992). Für die Berechnung eines molekularen Stammbaums mit MrBayes wurde eine Nexus Datei mit folgenden Befehlen und Informationen erstellt: outgroup=*HsWnt9*, Model of Substitution=Jones, nGen=20.000.000, samplefreq=10, Printfreq=100, nuber of chains=6, save branchlengs=yes. Postrun Einstellungen waren: burnin=10.000. Für die Errechnung von Stammbäumen mit PAUP wurden folgende Einstellungen gewählt: maxtrees=2000 autoincrease=100, heuristic search by random addition sequence with TBR, limit of 10,000,000 rearrangements.

## 5.8 Analyse der räumlichen Transkriptexpression

### 5.8.1 Herstellung von RNA-Sonden

Es wurden Digoxigeninmarkierte, einzelsträngige RNA-Sonden mit dem Dig-RNA-labeling System, nach Angaben des Herstellers (Roche) synthetisiert. Als Matrizen für die Reaktionen wurden PCR-Produkte verwendet. Als Matrize für diese PCR-Reaktionen wurden die Plasmidklone der PCR zur Erzeugung vollständiger kodierender Transkriptbereiche genutzt. Die PCR-Reaktion wurde mit den gleichen Reaktionsbedingungen wie die anderen PCR-Reaktionen durchgeführt (5'-Primer: M13, 3'-Primer M13 reverse). Die in diesen Reaktionen amplifizierten DNA-Sequenzen beinhalten die bakteriellen Promotoren T7 in 5'-Position vor der Klonierungsstelle und Sp6 in 3'-Position. Diese Promotoren wurden in jeweils getrennten Reaktionsansätzen durch T7 oder Sp6 DNA abhängige RNA Polymerasen für die Transkriptionsreaktion verwendet. In der Reaktion werden Digoxigenin markierte Uridinnukleotide in den RNA-Strang inkorporiert. Auf diese Weise wurden für jedes zu untersuchende Transkript eine zum Transkript komplementäre Sonde zur Detektion der Expression und eine Kontrollsonde mit zum Transkript identischer Sequenz synthetisiert.

### 5.8.2 Durchführung der in situ Hybridisierung

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte bei Raumtemperatur für 5 Minuten auf einem Schüttelgerät mit einer Frequenz von 5 Hz durchgeführt.

#### 5.8.2.1 Relaxieren und Fixieren von Tieren für die In situ-Hybridisierung

Primärpolypen wurden in Petrischalen mit Nematostellamedium überführt. Es wurde gewartet, bis sich die Tiere vollständig ausgestreckt hatten. Durch langsame Zugabe von 5ml  $\text{MgCl}_2$  ( $6\text{H}_2\text{O}$ ) 7,1% wurden die Tiere im ausgestreckten Zustand gehalten. Durch 3-maliges Waschen mit sauberem Nematostellamedium wurde überschüssiges  $\text{MgCl}_2$  entfernt. Anschließend wurden die Tiere eine Stunde lang in 4% Paraformaldehyd in MEM (50 mM MOPS, 1 mM EGTA, 0,5 mM Mg $\text{So}_4$ ) bei Raumtemperatur fixiert und anschließend über drei Schritte in 100% Methanol MeOH) überführt (1. 25% MeOH + 75% Fixativ, 2. 50% MeOH + 50% Fixativ, 3. 75% MeOH + 25% Fixativ). Die Tiere wurden bis zum weiteren Gebrauch, mindestens aber 24 Stunden lang bei  $-80^\circ\text{C}$  in 100% Methanol gelagert.

#### 5.8.2.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Zunächst wurden die fixierten Tiere über eine Methanol + PBT-Reihe rehydriert (100% MeOH, 75% MeOH + 25% PBT, 50% MeOH + 50% PBT, 25% MeOH + 75% PBT, 2 mal 100% PBT). Darauf folgte die Hydrolyse von Proteine um das Gewebe für die Sonde zugänglich zu machen durch Inkubation mit Proteinase K (20  $\mu\text{g}$  / ml [20 U / mg] 1:50 in PBT) für 18 min bei Raumtemperatur. Diese Enzymreaktion wurde 10 min mit einer 0,4% Glycinlösung (Stammlösung 4% in dd  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 : 10 mit PBT verdünnt) gestoppt. Darauf folgten zwei Behandlungen mit 0,1 M Trietholamin (TEA) und 0,25% (v/v) Acetanhydrid (gelöst in 0,1M TEA). Anschließend wurde 2 mal mit PBT gewaschen. Die Tiere wurden daraufhin mit dem o.g. Fixativ 20 min refixiert, das Fixativ wurde durch 5 maliges waschen mit PBT wieder entfernt. Nach einer Waschung mit 50% Hybridisierungslösung und 50% PBT wurden die Tiere für eine Prähybridisierung (12 Stunden bei  $44^\circ\text{C}$ ) in

100% Hybridisierungslösung überführt. Nach dieser Präinkubation wurde die RNA-Sonde (25 ng auf 100µl) in frischer Hybridisierungslösung zugegeben und für mindesten, 60 Stunden bei 44°C inkubiert.

#### 5.8.2.3 Posthybridisierungswaschungen, Blockierungsschritte und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierungsreaktion wurde nicht an das Zieltranskript- und falsch gebundene Sonde gründlich abgewaschen, da sonst Hintergrund entsteht. Hierfür wurden 9 Schritte (jeweils mindestens 30 min) durchgeführt, während denen die Stringenz durch Temperaturerhöhung und Verringerung der Salzkonzentration der Waschlösung schrittweise erhöht wurde. Jeweils zwei Waschschrte wurde bei gleicher Temperatur und gleicher SSC-Waschlösung (3 M Natriumchlorid + 0,3 M Natriumcitrat pro Liter entspricht 20-fach konzentrierter Lösung)

1. und 2. Waschschrte: 50% Formamid, 50% SSC-4-fach, 47°C

2. und 3. Waschschrte: 50% Formamid, 50% SSC-2-fach, 50°C

4. und 5. Waschschrte: 50% Formamid, 50% SSC-1-fach, 53°C

6. und 7. Waschschrte: 50% Formamid, 50% SSC-0,5-fach, 56°C

9. Waschschrte: 50% Formamid, 50% SSC-0,5-fach, Raumtemperatur

Die verwendeten Lösungen wurden immer vor der Benutzung auf die Inkubationstemperatur erwärmt. Während des letzten Waschschrtes wurde die vorgewärmte Lösung mit den Tieren zu Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Tiere 2 mal mit PBT und dann 2 mal mit Maleinsäurepuffer (MAB, 100 mM Maleinsäure + 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden die Tiere in frischer MAB-Lösung mit Blockingreagenz nach Angaben des Herstellers (Roche) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Blockadebehandlung wurde der Antikörper (Roche anti-Dig F<sub>AB</sub>-Fragmente; AP konjugiert) in einer 1 : 2000 Verdünnung in frischer Lösung gleicher Zusammensetzung wie zuvor inkubiert.

Es wurde 8-mal mit MAB für mindestens 1 Stunde inkubiert, anschließend wurden die Tiere über Nacht in frischer MAB-Lösung bei 4°C inkubiert.

#### 5.8.2.4 Detektion der gebundenen Sonden

Es wurde 2-mal mit NTMT-Lösung (100 mM Natriumchlorid, 100 mM TrisHCL pH 9,5, 50 mM Magnesiumchlorid, 0,1% Tween20) gewaschen, anschließend 2 weitere Male unter Zugabe von Levamisol (1 : 1000). Danach wurde die Farbreaktion mit NBT / BCIP nach Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Die Inkubationszeit für die Färbungen lag je nach verwendeter Sonde zwischen 15 min und 8 Stunden. Die Färbereaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch die Zugabe von 100% Ethanol gestoppt und dabei der Farbkontrast erhöht. Nach 3 Waschschritten mit PBS wurden die Tiere in PBS / Glyzeringemisch ( 1 : 9) auf Objektträgern montiert.

#### 5.9 Über- und Fremdexpression von mRNA durch Injektionen

Es wurden Funktionsstudien mit den Transkripten *NvWnt11* und *NvWntA* durchgeführt. Zunächst wurde die *NvWnt11* mRNA in *N. vectensis* durch Injektion überexprimiert um Störungen in der Musterbildung zu erzeugen die Rückschlüsse auf die Funktion dieses Transkriptes zulassen. In den folgenden Experimenten wurden *NvWntA* und *NvWnt11* in *Xenopus laevis* fremdexprimiert um zu identifizieren, ob sie in *Xenopus* die gleiche Funktion wie die endogenen Transkripte übernehmen können.

##### 5.9.1 Herstellung der Matrizen für die Synthese von mRNA

Für die Transkription zu mRNA müssen die Vollängenklone in einen geeigneten Expressionsvektor (pCS-2+) gebracht werden. Hierfür wurden Primer synthetisiert, welche in ihrer Sequenz den jeweiligen inneren Primern für die PCR zur Erzeugung vollständiger kodierender Transkriptbereiche (s.o.) entsprachen. Zusätzlich zu dieser Primersequenz wurde am 3'-Ende des jeweiligen Primers die Erkennungssequenz für eine bestimmte Restriktionsendonuklease, sowie die Basen G und C ergänzt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind in der Primersequenz unterstrichen (5'-Primer: *NvWntA*-5'-BamHI 5'-GAGATGGCTGTCTCCGTTGCGGATCCGC-3' und *NvWnt11*-5'-EcoRI 5'-GATCAGTAAAGCAGGGAGGAATTCGC-3'; 3'-Primer:

*NvWntA*-3'-XhoI 5'-GCCTCGAGGGGGGCTTTATCGGCATC-3' und *NvWnt11*-3'-XhoI 5'-GCCTCGAGGACGTAAGTAATCTGACC-3'). Als Matrize für die PCR-Reaktionen wurden die Plasmidklone mit den vollständigen kodierenden Bereichen der Gene *NvWntA* und *NvWnt11* verwendet. Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie in den zuvor beschriebenen Reaktionen. An die für *NvWntA* kodierende Sequenz wurde durch die PCR-Reaktion an der 5'-Seite die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym BamHI, an die 3'-Seite die für XhoI angefügt, an die für *NvWnt11* kodierende Sequenz die Erkennungsstellen für EcoRI am 5'-Ende und für XhoI am 3'-Ende. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit den zu den Primern korrespondierenden Restriktionsenzymen nach den Angaben des Herstellers (Amersham) inkubiert und mit dem NucleoTrap System nach Angaben des Herstellers (Macherey und Nagel) gereinigt. Anschließend wurde der Zielvektor mit den beiden zu den jeweiligen Erkennungsstellen korrespondierenden Enzymen nach Angaben des Herstellers (Amersham) geschnitten und ebenfalls mit dem NucleoTrap System gereinigt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit T4-Ligase nach Angaben des Herstellers (Promega) in den Zielvektor ligiert. Das so erzeugte Plasmid wurde wie in (5.5) beschrieben, in Bakterien transformiert, amplifiziert und nach Aufreinigung zur Sequenzierung eingeschickt (Fa. GATC).

### 5.9.2 mRNA-Synthese

Vektoren, welche die gewünschte DNA-Sequenz erhalten hatten, wurden mit der Restriktionsendokuklease Apal nach Angaben des Herstellers (Amersham) linearisiert und mit dem NucleoTrap System gereinigt. Der linearisierte pCS2+ Vektor mit den internalisierten Transkriptsequenzen wurde als Template für die in vitro Transkriptionsreaktion mit dem messageMachine System nach Angaben des Herstellers (Ambion) verwendet. Die Produkte der Transkriptionsreaktionen wurden mit dem RNAeasy System nach Angaben des Herstellers (Qiagen) gereinigt, die Konzentration der mRNA auf 250ng / µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.



### 5.9.3 Überexpression durch Injektion von endogener mRNA in *N. vectensis* Embryonen

*N. vectensis* Eier wurden befruchtet und anschließend mit Cysteinlösung (3% in Nematostellamedium pH 7,8 für 20 min) aus der Gallerte gelöst. Sobald Zellgrenzen in den sich entwickelnden Embryonen sichtbar wurden, wurde in je eines der Blastomeren 2 nl *NvWnt1* mRNA Lösung injiziert. Die Embryonen wurden täglich optisch kontrolliert und gezählt. Die Anzahl an morphologisch anormalen Embryonen wurde notiert. Als Injektionsnadeln wurden ausgezogene Glaskapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 5 – 10 µm verwendet. Das Injektionsvolumen wurde anhand der Tröpfchengröße mit einem Objektmikrometers ( $4/3\pi r^3/2$ ) bestimmt.

### 5.9.4 Fremdexpression von *N. vectensis* Wnt mRNA in *Xenopus laevis* Embryonen durch Injektion

Eigelege von *Xenopus* wurden gewonnen, indem den Muttertieren am Abend vor den Injektionsexperimenten jeweils 600 U humanes Gonotrophin subcutan injiziert wurde. Die Eigelege wurden durch sanftes Abstreifen der Frösche in Petrischalen erhalten. Männliche Gameten wurden durch die Präparation und Mazeration der Hoden gewonnen. Es wurden pro Befruchtungsvorgang 100 µl der Hodenmazerationslösung mit 900 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt, zu den Eiern gegeben und sehr gründlich gemischt. Nach der Befruchtung der Eier, welche an dem Erfolgen der Kortikalrotation deutlich zu erkennen ist, wurden die Embryonen durch 10minütige Behandlung mit 2% Cysteinlösung aus der sie umgebenden Gallerte gelöst. Für die Injektion in *Xenopus* Embryonen wurden die Injektionsnadeln auf die gleiche Weise angefertigt verwendet wie bei den Injektionen in *N. vectensis* Embryonen.

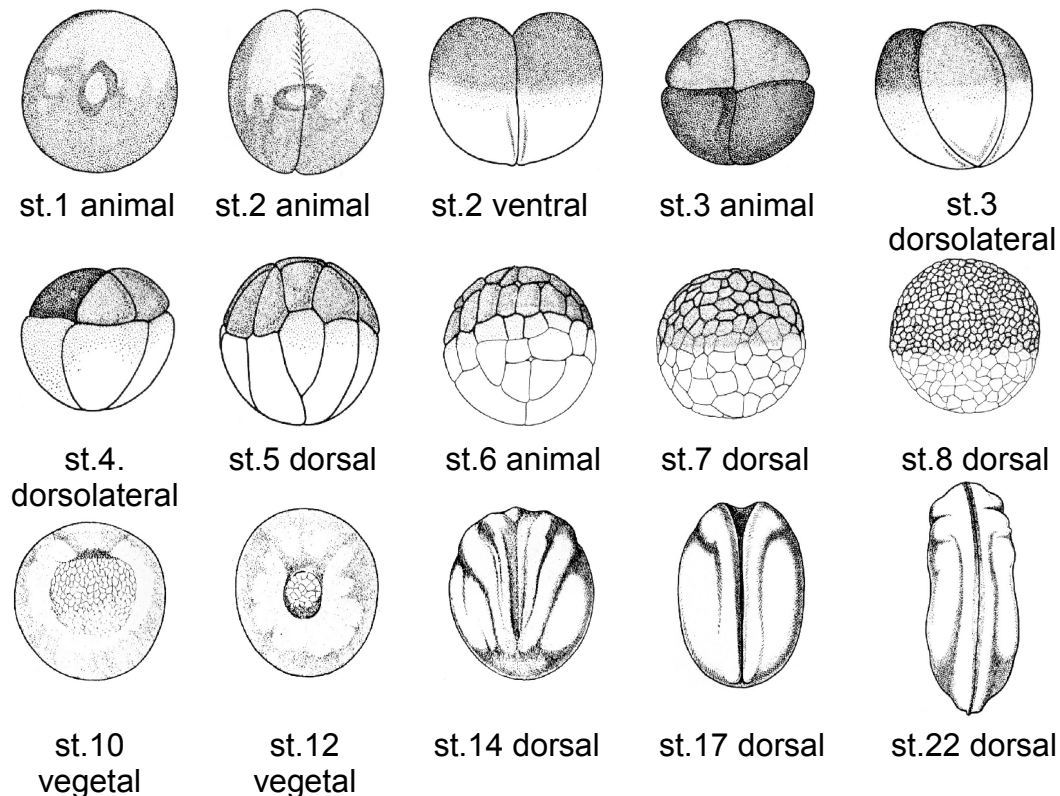


Abb.49: Übersicht über die frühen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis*.

Aufeinander Folgende Stadien der *Xenopus* Embryonalentwicklung von der Zygote bis zum Stadium 22 (st.22). Unter den Einzelbilder befindet sich die Bezeichnung des jeweiligen Entwicklungsstadium sowie die Ansicht des Embryos (z.B. animal). Bilder: [www.xenbase.org](http://www.xenbase.org).

Es wurden im 4-Zellstadium (st.3) jeweils 4nl mRNA Lösung entweder in beide dorsale- oder beide ventrale Blastomeren injiziert. Die dorsalen Blastomere sind im 4-Zellstadium oft etwas mehr pigmentiert und etwas kleiner als die ventralen. Die Unterscheidung der Blastomeren ist jedoch nicht immer möglich, daher muß der entstehende Fehler in der Auswertung über eine größere Menge an injizierten Individuen ausgeglichen werden. Gastrulationsdefekte können frühestens im Stadium 12 erkannt werden. Der Blastoporus dieser Embryonen kann nicht geschlossen werden. Die endgültige Auszählung der Injektionsexperimente wurden im Stadium 22 vorgenommen. In diesem Stadium ist der Gastrulationsdefekt an einer starken Krümmung des Embryos nach einer Seite hin deutlich sichtbar. Das endodermale Gewebe ist auf der Innenseite der Krümmung an der Oberfläche zu sehen. Der Entwicklungsdefekt „doppelte Achse“ ist frühestens im Stadium 17 deutlich zu erkennen. Hier sind 2 V-förmig aufeinander zulaufende Neuralrinnen zu sehen.

#### 5.9.5 Reduktion endogener mRNA durch Injektion von Morpholinos in *Xenopus laevis*

Das verwendete Oligonukleotid war ein 25 Nukleotide langes X/wnt11-antisense Morpholino (Gene Tools LCC) mit der Sequenz 5'- CCAGTGACGGGTCGGAGCC ATTGGT-3' (Pandur et al., 2002). Das Morpholino wurde 1:8 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in die dorsalen Blastomere injiziert. Der Phänotyp wurde im Stadium 22 ausgewertet.

#### 5.9.6 Rettung der Entwicklungsfähigkeit morpholinobehandelter *Xenopus laevis* Embryonen durch die Injektion von homologer mRNA aus *N. vectensis*

Das XWnt11 Morpholino wurde 1:4 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit der NvWnt11 mRNA ( jeweils zu gleichen Volumenteilen) gemischt. Diese Lösung wurde in die dorsalen Blastomere injiziert. Die Wirkung der Injektionen wurde im Stadium 22 ausgewertet.

#### 5.10 Mikroskopie und Photographie der Präparate

Die Präparate wurden mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss) mikroskopiert und mit einer digitalen Kamera (Canon G5) aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop

1. Abi-Rached, L., Gilles, A., Shiina, T., Pontarotti, P. & Inoko, H. Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat Genet* 31, 100-5 (2002).
2. Angerer, L. M. & Angerer, R. C. Patterning the sea urchin embryo: gene regulatory networks, signaling pathways, and cellular interactions. *Curr Top Dev Biol* 53, 159-98 (2003).
3. Baguna, J. & Riutort, M. The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms. *Bioessays* 26, 1046-57 (2004).
4. Ball, E. E., Hayward, D. C., Saint, R. & Miller, D. J. A simple plan--cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nat Rev Genet* 5, 567-77 (2004).
5. Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F. & Schoenle, E. J. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 351, 792-8 (2004).
6. Boffa, L. C., Vidali, G. & Allfrey, V. G. Changes in nuclear non-histone protein composition during normal differentiation and carcinogenesis of intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 98, 396-410 (1976).
7. Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K. & Lifton, R. P. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-21 (2002).
8. Brandhorst, B. P. & Klein, W. H. Molecular patterning along the sea urchin animal-vegetal axis. *Int Rev Cytol* 213, 183-232 (2002).
9. Bridge, D., Cunningham, C. W., DeSalle, R. & Buss, L. W. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Mol Biol Evol* 12, 679-89 (1995).
10. Bridge, D., Cunningham, C. W., Schierwater, B., DeSalle, R. & Buss, L. W. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8750-3 (1992).
11. Brooke, N. M. & Holland, P. W. The evolution of multicellularity and early animal genomes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 599-603 (2003).
12. Brown, J. M. & Firtel, R. A. Regulation of cell-fate determination in *Dictyostelium*. *Dev Biol* 216, 426-41 (1999).
13. Cadigan, K. M. & Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-305 (1997).
14. Chen, J. Y., Oliveri, P., Gao, F., Dornbos, S. Q., Li, C. W., Bottjer, D. J. & Davidson, E. H. Precambrian animal life: probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest China. *Dev Biol* 248, 182-96 (2002).
15. Chen, J. Y., Oliveri, P., Li, C. W., Zhou, G. Q., Gao, F., Hagadorn, J. W., Peterson, K. J. & Davidson, E. H. Precambrian animal diversity: putative phosphatized embryos from the Doushantuo Formation of China. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4457-62 (2000).
16. Christian, J. L., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Moon, R. T. Xwnt-8, a *Xenopus* Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* 111, 1045-55 (1991).
17. Coates, J. C., Grimson, M. J., Williams, R. S., Bergman, W., Blanton, R. L. & Harwood, A. J. Loss of the beta-catenin homologue *aardvark* causes ectopic stalk formation in *Dictyostelium*. *Mech Dev* 116, 117-27 (2002).
18. Collins, A. G. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: an analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15458-63 (1998).

19. Cook, C. E., Jimenez, E., Akam, M. & Salo, E. The Hox gene complement of acoel flatworms, a basal bilaterian clade. *Evol Dev* 6, 154-63 (2004).
20. Daly, M., Lipscomb, D. L. & Allard, M. W. A simple test: evaluating explanations for the relative simplicity of the Edwardsiidae (Cnidaria: Anthozoa). *Evolution Int J Org Evolution* 56, 502-10 (2002).
21. Dasgupta, R., Kaykas, A., Moon, R. T. & Perrimon, N. Functional Genomic Analysis of the Wnt-Wingless Signaling Pathway. *Science* (2005).
22. Davidson, B. & Levine, M. Evolutionary origins of the vertebrate heart: Specification of the cardiac lineage in *Ciona intestinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11469-73 (2003).
23. Degnan, B. M., Degnan, S. M., Giusti, A. & Morse, D. E. A hox/hom homeobox gene in sponges. *Gene* 155, 175-7 (1995).
24. Dewel, R. A. Colonial origin for Emetazoa: major morphological transitions and the origin of bilaterian complexity. *J Morphol* 243, 35-74 (2000).
25. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15, 2625-34 (1995).
26. Finnerty, J. R. The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int J Dev Biol* 47, 523-9 (2003).
27. Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D. & Martindale, M. Q. Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science* 304, 1335-7 (2004).
28. Fischer, L., Boland, G. & Tuan, R. S. Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* 84, 816-31 (2002).
29. Fleischer, B. Mechanism of glycosylation in the Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem* 31, 1033-40 (1983).
30. Frank, P. G. & J.S., B. Asexual reproduction, diet, and anomalies of the anemone "*Nematostella vectensis*" in Nova Scotia. *Can. Field-Nat.* 92, 259-262 (1978).
31. Fritzenwanker, J. H. Beschreibung der Embryonalentwicklung und Charakterisierung eines *Fork Head* Homologs aus *Nematostella vectensis*. Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt (2004).
32. Fritzenwanker, J. H., Saina, M. & Technau, U. Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*. *Dev Biol* 275, 389-402 (2004).
33. Fritzenwanker, J. H. & Technau, U. Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis*(Anthozoa). *Dev Genes Evol* 212, 99-103 (2002).
34. Frohman, M. A. PCR Primer a Laboratory manual. Dieffenbach, C.W. and Dveksler, G.S. CSHL New York, 381-409 (1995).
35. Gierer, A. & Meinhardt, H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12, 30-9 (1972).
36. Gilbert, S. F. & Raunio, A. M. Embryology, Constructing the Organism. ISBN 0-87893-237-2 (1997).
37. Giles, R. H., van Es, J. H. & Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24 (2003).

38. Giudice, G. Conserved cellular and molecular mechanisms in development. *Cell Biol Int* 25, 1081-90 (2001).
39. Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M. L., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C. A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R. & Warman, M. L. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-23 (2001).
40. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113 (1991).
41. Harwood, A. J., Plyte, S. E., Woodgett, J., Strutt, H. & Kay, R. R. Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* 80, 139-48 (1995).
42. Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L. & Shoe, J. L. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol Biol* 4, 2 (2004).
43. Herman, M. A., Vassilieva, L. L., Horvitz, H. R., Shaw, J. E. & Herman, R. K. The *C. elegans* gene *lin-44*, which controls the polarity of certain asymmetric cell divisions, encodes a Wnt protein and acts cell nonautonomously. *Cell* 83, 101-10 (1995).
44. Hobmayer, B., Rentzsch, F., Kuhn, K., Happel, C. M., von Laue, C. C., Snyder, P., Rothbacher, U. & Holstein, T. W. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407, 186-9 (2000).
45. Holland, L. Z. Heads or tails? *Amphioxus* and the evolution of anterior-posterior patterning in deuterostomes. *Dev Biol* 241, 209-28 (2002).
46. Holland, P. W. More genes in vertebrates? *J Struct Funct Genomics* 3, 75-84 (2003).
47. Holland, P. W. & Garcia-Fernandez, J. Hox genes and chordate evolution. *Dev Biol* 173, 382-95 (1996).
48. Holstein, T. & Tardent, P. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* 223, 830-3 (1984).
49. Hoppler, S. & Moon, R. T. BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mech Dev* 71, 119-29 (1998).
50. Huang, H. C. & Klein, P. S. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 5, 234 (2004).
51. Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-5 (2001).
52. Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. & Hall, B. MrBayes: A program for the Bayesian inference of phylogeny. *MrBayes Manual* (2000).
53. Jakob, W., Sagasser, S., Dellaporta, S., Holland, P., Kuhn, K. & Schierwater, B. The *Trox-2* Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Dev Genes Evol* 214, 170-5 (2004).
54. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8, 275-82 (1992).

55. Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., Iwamoto, Y., Kawamori, R., Kikkawa, R., Nakamura, Y. & Maeda, S. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 75, 832-43 (2004).
56. Katoh, M., Kirikoshi, H., Saitoh, T., Sagara, N. & Koike, J. Alternative splicing of the WNT-2B/WNT-13 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 209-16 (2000).
57. Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-Matbouli, M., Dessler, S. S., Devlin, R. H., Feist, S. W., Hedrick, R. P., Hoffmann, R. W., Khattra, J., Hallett, S. L., Lester, R. J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M. E. & Xiao, C. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48, 395-413 (2001).
58. Kiecker, C. & Niehrs, C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128, 4189-201 (2001).
59. King, N., Hittinger, C. T. & Carroll, S. B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301, 361-3 (2003).
60. Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A. & Ueno, N. PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev* 17, 1663-76 (2003).
61. Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D. & et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-5 (1991).
62. Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. & Clevers, H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-83 (1998).
63. Kruse, M., Mikoc, A., Cetkovic, H., Gamulin, V., Rinkevich, B., Muller, I. M. & Muller, W. E. Molecular evidence for the presence of a developmental gene in the lowest animals: identification of a homeobox-like gene in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mech Ageing Dev* 77, 43-54 (1994).
64. Ku, M. & Melton, D. A. Xwnt-11: a maternally expressed *Xenopus* wnt gene. *Development* 119, 1161-73 (1993).
65. Kuhl, M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9, 967-74 (2004).
66. Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-11 (2000).
67. Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R. & Kuo, C. J. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 266-71 (2004).
68. Kusserow, A. PCR-Suche und Charakterisierung der Wnt- und Tcf-Promotoren und der Struktur dieser Gene aus *Hydra vulgaris*. Diplomarbeit am Fachbereich der Biologie der Technischen Universität Darmstadt (2001).
69. Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q. & Holstein, T. W. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156-60 (2005).
70. Labus, M. B., Stirk, C. M., Thompson, W. D. & Melvin, W. T. Expression of Wnt genes in early wound healing. *Wound Repair Regen* 6, 58-64 (1998).

71. Lake, B. B. & Kao, K. R. Early head specification in *Xenopus laevis*. *ScientificWorldJournal* 3, 655-76 (2003).
72. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., LeHoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. & Chen, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921 (2001).
73. Landesman, Y. & Sokol, S. Y. Xwnt-2b is a novel axis-inducing *Xenopus* Wnt, which is expressed in embryonic brain. *Mech Dev* 63, 199-209 (1997).
74. Le Gouar, M., Guillou, A. & Vervoort, M. Expression of a SoxB and a Wnt2/13 gene during the development of the mollusc *Patella vulgata*. *Dev Genes Evol* 214, 250-6 (2004).
75. Lee, H. Y., Kleber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M. M., Kemler, R. & Sommer, L. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science* 303, 1020-3 (2004).
76. Lengyel, J. A. & Iwaki, D. D. It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev Biol* 243, 1-19 (2002).
77. Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S. P., Swain, P. M., Zhao, S. C., Eustace, B., Lappe, M. M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M. G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K. M., Anisowicz, A., Morales, A. J., Lomedico, P. T., Recker, S. M., Van Eerdewegh, P., Recker, R. R. & Johnson, M. L. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70, 11-9 (2002).



78. Lyons, K. M. Collar cells in planula and adult tentacle ectoderm of the solitary coral *Balanophyllia regia* (Anthozoa Eupsammiidae). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 145, 57-74 (1973).
79. Marsal, M., Pineda, D. & Salo, E. Gtwn-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. *Gene Expr Patterns* 3, 489-95 (2003).
80. Martindale, M. Q., Pang, K. & Finnerty, J. R. Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development* 131, 2463-74 (2004).
81. Martinelli, C. & Spring, J. Expression pattern of the homeobox gene *Not* in the basal metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Gene Expr Patterns* 4, 443-7 (2004).
82. Martinez, A. Lopez, J., Villaro, A. C. & Sesma, D. P. Choanocyte-like cells in the digestive system of the starfish *Marthasterias glacialis* (Echinodermata). *Journal of Morphology* 208, 215 - 225 (2005).
83. McGrew, L. L., Otte, A. P. & Moon, R. T. Analysis of *Xwnt-4* in embryos of *Xenopus laevis*: a Wnt family member expressed in the brain and floor plate. *Development* 115, 463-73 (1992).
84. McMahon, A. P. & Bradley, A. The *Wnt-1* (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-85 (1990).
85. Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D. & Sogin, M. L. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9707-12 (2001).
86. Meijer, L., Thunnissen, A. M., White, A. W., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L. H., Walter, J., Cleverley, K. E., Salinas, P. C., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Kim, S. H. & Pettit, G. R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol* 7, 51-63 (2000).
87. Mire, P. Evidence for Stretch-Regulation of Fission in a Sea Anemone. *J. Exp. Zool.* 282, 344-359 (1998).
88. Mlodzik, M. Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. *Embo J* 18, 6873-9 (1999).
89. Nakagawa, S., Takada, S., Takada, R. & Takeichi, M. Identification of the laminar-inducing factor: Wnt-signal from the anterior rim induces correct laminar formation of the neural retina in vitro. *Dev Biol* 260, 414-25 (2003).
90. Nelson, W. J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-7 (2004).
91. Ng, M. & Yanofsky, M. F. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet* 2, 186-95 (2001).
92. Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L. & Muller, U. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74, 558-63 (2004).
93. Ninomiya, H., Elinson, R. P. & Winklbauer, R. Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature* 430, 364-7 (2004).
94. Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. & Hedge, P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665-9 (1991).

95. Nojima, H., Shimizu, T., Kim, C. H., Yabe, T., Bae, Y. K., Muraoka, O., Hirata, T., Chitnis, A., Hirano, T. & Hibi, M. Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish. *Mech Dev* 121, 371-86 (2004).
96. Nusse, R. An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet* 17, 443 (2001).
97. Nusse, R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28-32 (2005).
98. Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801 (1980).
99. Ohno, S. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag (1970).
100. Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M. & Kuhl, M. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418, 636-41 (2002).
101. Panopoulou, G., Hennig, S., Groth, D., Krause, A., Poustka, A. J., Herwig, R., Vingron, M. & Lehrach, H. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res* 13, 1056-66 (2003).
102. Pearson, C. V., Rogers, A. D. & Shearer, M. The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. *Mol Ecol* 11, 2285-93 (2002).
103. Penton, A. & Hoffmann, F. M. Decapentaplegic restricts the domain of wingless during *Drosophila* limb patterning. *Nature* 382, 162-4 (1996).
104. Peterson, K. J. & Eernisse, D. J. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol Dev* 3, 170-205 (2001).
105. Phillips, A., Janies, D. & Wheeler, W. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 16, 317-30 (2000).
106. Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. & Clevers, H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17, 1709-13 (2003).
107. Plyte, S. E., O'Donovan, E., Woodgett, J. R. & Harwood, A. J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during Dictyostelium development via the serpentine receptor cAR3. *Development* 126, 325-33 (1999).
108. Primus, A. & Freeman, G. The cnidarian and the canon: the role of Wnt/beta-catenin signaling in the evolution of metazoan embryos. *Bioessays* 26, 474-8 (2004).
109. Prud'homme, B., de Rosa, R., Arendt, D., Julien, J. F., Pajaziti, R., Dorresteyn, A. W., Adoutte, A., Wittbrodt, J. & Balavoine, G. Arthropod-like expression patterns of engrailed and wingless in the annelid *Platynereis dumerilii* suggest a role in segment formation. *Curr Biol* 13, 1876-81 (2003).
110. Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A. & Vervoort, M. Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr Biol* 12, 1395 (2002).
111. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-4 (2003).
112. Salvini-Plawen, L. & Splechna, H. On the origin and evolution of the lower metazoa. *Z. f. Zool. Systematik Evolutionsforschung* 16, 40-88 (1979).
113. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y. & Nakamura, Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24, 245-50 (2000).

114. Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. & von Haeseler, A. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18, 502-4 (2002).
115. Schneider, V. A. & Mercola, M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15, 304-15 (2001).
116. Schoenwolf, G. C. Principles of developmental biology. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 268-9 (2002).
117. Scholz, C. B. & Technau, U. The ancestral role of Brachyury: expression of *NemBra1* in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Dev Genes Evol* 212, 563-70 (2003).
118. Schroeder, K. E., Condic, M. L., Eisenberg, L. M. & Yost, H. J. Spatially regulated translation in embryos: asymmetric expression of maternal Wnt-11 along the dorsal-ventral axis in *Xenopus*. *Dev Biol* 214, 288-97 (1999).
119. Schubert, M., Holland, L. Z., Holland, N. D. & Jacobs, D. K. A phylogenetic tree of the Wnt genes based on all available full-length sequences, including five from the cephalochordate amphioxus. *Mol Biol Evol* 17, 1896-903 (2000).
120. Shearer, M., Suwailem, A.M. & Rowe, G.A. The anemone, *Nematostella vectensis*, in Britain: considerations for conservation management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 7, 13-25 (1997).
121. Sheldahl, L. C., Park, M., Malbon, C. C. & Moon, R. T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9, 695-8 (1999).
122. Slusarski, D. C., Corces, V. G. & Moon, R. T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-3 (1997).
123. Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Busa, W. B. & Moon, R. T. Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182, 114-20 (1997).
124. Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Papkoff, J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 4, 1267-75 (1993).
125. Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T. & Melton, D. A. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* 67, 741-52 (1991).
126. Stephenson, T. A. *The British Sea Anemones Volume II.* (1935).
127. Storch, V. & Welsch, U. *Systematische Zoologie*. 4. überarbeitete Auflage (1991).
128. Strimmer, K. & Haeseler, A. v. Quartet Puzzling: A Quartet Maximum-Likelihood Method for Reconstructing Tree Topologies. *Mol Biol Evol* 13, 964-969 (1996).
129. Sturm, K. Klonierung und Charakterisierung von  $\beta$ -Catenin/Wnt-Homologen aus *Nematostella vectensis*. Diplomarbeit an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2000).
130. Taipale, J. & Beachy, P. A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349-54 (2001).
131. Tanaka, K., Kitagawa, Y. & Kadowaki, T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277, 12816-23 (2002).
132. Tardent, P. *Meeresbiologie*. Thieme Verlag: 2., neubearb. u. erw. Aufl. 1993. (1993).

133. Te, K. G. & Reggiani, C. Skeletal muscle fibre type specification during embryonic development. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 65-9 (2002).
134. Technau, U. & Scholz, C. B. Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int J Dev Biol* 47, 531-9 (2003).
135. Wallingford, J. B., Rowning, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E. & Harland, R. M. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81-5 (2000).
136. Weeks, G. Signalling molecules involved in cellular differentiation during *Dictyostelium* morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3, 625-30 (2000).
137. Weiss, K. M. The phenogenetic logic of life. *Nat Rev Genet* 6, 36-45 (2005).
138. West, C. M. Current ideas on the significance of protein glycosylation. *Mol Cell Biochem* 72, 3-20 (1986).
139. Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., Bince, J. M., Xu, R. & Martindale, M. Q. An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* 426, 446-50 (2003).
140. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd & Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-52 (2003).
141. Yasui, K., Saiga, H., Wang, Y., Zhang, P. J. & Semba, I. Early expressed genes showing a dichotomous developing pattern in the lancelet embryo. *Dev Growth Differ* 43, 185-94 (2001).
142. Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. & Thomas, J. B. Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* 422, 583-8 (2003).

## Abkürzungen:

BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy- oder auch complementary DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethyl-pyrokarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxinukleosidtriphosphat
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
LB	Luria-Bertani
MAB	Maleinsäure Puffer
MeOH	Methanol
mRNA	Messenger RNA
NBT / BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
PBS	Phosphatagepufferte Kochsalzlösung
PBT	PBS mit 0,02% TrinitotX-100
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RACE	Rapid amplifikation of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SSC	Natriumchlorid / Natriumcitrat-Puffer

Alignment der neuer Wnt-Sequenzen aus *N. vectensis*, *Ciona intestinalis* und *Achaearanea tepidariorum*

```

      *      20      *      40      *      60      *
AtWnt1 : GRGFAPHTLIRKKRRRLVRENEGAMTAIGRGVR-LSISECK QFKRRRN PTIDYT-RGRN--IFGKIVQK-GC : 70
CiWnt4 : -Y--DSLRYIKPYCYQRCLQPTLMAVISDGIK-SGIRECC QFNRSKWN STYPGPP--GRH-AHPILKA-RG : 68
AtWnt5 : -L--SRLSGISRGCTKLC-LYQDHMAHVARGAR-LGIHECC QFNRRRN STVDD---SS--VPGVPLNI-GS : 65
NvWnt3 : -L--YVTRQFNSRQVEVC-KNPDLMEHVAHGAK-YGVHECC QFNRRRN STIRES---GS--IESVLSK-GC : 66
AtWnt7-1 : -L--NKIPGITMGRIFC-TRPDIVVAIGBCTR-LGVAECC QFRRHRWN STIGS----N-QVFGHVIVV-GS : 65
AtWnt7-2 : -I--SKIPGITTPAQRLC-ERPDLIVAVGDCAR-MGINECC RFRHRWN TAIGS----S-YVFGHVIVV-GS : 65
AtWnt2 : -L--GGIPGIARCKREIC-QHPDILLSVTGKAR-IGVSECC QFNRRRN STLGG--AS--VPGSHMLKVDS : 67
NvWnt16 : -S--SRVPGISLQCLRMCKQKPDVIPSVSQGAN-IGIHECC QFRRHRWN ST-SND---PT--VPGTLLKI-AH : 65
AtWnt16 : -M--SSVPGIVMQQKVC-AHPAVIKAVSSGAK-RGIHECC QFRRHRWN TIEGGE---S--VDHTLQK-RG : 65

      80      *      100      *      120      *      140      *
AtWnt1 : REAFIYAITTSAGVTHAMARAREGLVTS--SDYKRR-G---P-----S-GLD-EDWGGSDNIEFGSKFT : 130
CiWnt4 : REAFVYAITLSAAYSYEITRAAGNAMLSEGGAKINPHDR-----KR--G-C--NFVWGGSDVVKIGDEIS : 131
AtWnt5 : REAGFAHVAAAGVHTVSRGRLGQLSN--GSGRAMR-----PKNLH-RD--WVWGGSDNIEFGYRFT : 126
NvWnt3 : REAFVHVAVTAAGVAHSVDAAGSR-IESLDNRNLS-GR-----SS--K-C--WVWGGSDNIEFGVWFS : 126
AtWnt7-1 : REAFYMYSVTSAGVTFVITQSSRCNV-SDGGD-KSQ-SS---VKPLNH-P--TD--WVWGGSDVVKIGIRLS : 129
AtWnt7-2 : REAFYTYAVTSAGVTYAITQAQSGCTL-WHGGD-ISK-DGM-----LD-PE-CG--WVWGGSDVVRHGMKMS : 127
AtWnt2 : REAFIYAITTSAGVTHAIRS--SRCEI-PNPPDPLRR-GF-----GFDPVCG--YSWGGSH-ISAQVKFA : 130
NvWnt16 : REAFVYAITTSAGVHVAGKSSKGNL-TESSCESKR--GAR-----NQ-PK-C--WVWGGSDNVNYGVWLS : 126
AtWnt16 : REAFIYAITTSAGATHAVTQAASGNL-TDSSDTSRQ-GQSM-----PE-C--WVWGGSDNVRYGMFA : 126

      160      *      180      *      200      *      220
AtWnt1 : KQEVGAARRGK-D-----LRFTMNHNNHNEAGRTHVAAGMRQCK-HGMSGSTVQT-WMQLPPEBRAVDGLK : 196
CiWnt4 : RSLDGDIVTAKSMKK-----QLRKHNSAAGRMVVTNSMRKVCK-HGITGSAQTWRSMPTLRFISHRIK : 198
AtWnt5 : EGEVLVKKREINHAR-GSREQGRKLMNHNNHNEAGRAVIRKVRVTK-HGVSGSSLVT-WQQLAPREVGYLTK : 200
NvWnt3 : KQTEARARG-----DDLQIMNRRHNSRAGRKALELVWRKYCK-HGMSGSMKTVWQQANRQIGDHLK : 192
AtWnt7-1 : RQIDARAMEGD-----ARSLMNHNNHAGRAVKHNLKTECK-HGVSGSTMKT-WKTLPEAQIGDYLM : 195
AtWnt7-2 : RQIDARAMEGD-----ERSLMNHNNHAGRAVKLFTVQTECK-HGVSGSTMKT-WKTLPEAQIGDYLM : 193
AtWnt2 : RQIDARADRRKD-----ARALMNHNNHAGRAVKQKTRLQCK-HGVSGSASRT-WSAQMEPREVGRLLK : 197
NvWnt16 : KTEVDAPAKADRRRA---RSQRARAMNHNNHNEAGRAVLALMRVQCK-HGVSSSAVKT-SKSLPKHEEVGEALK : 198
AtWnt16 : RQVDAPARAERKR-----DVRALMNHNNHAGRAVIAQRMELKCK-HGVSGSELKT-WNKLPSEQVGHFLK : 195

      *      240      *      260      *      280      *      300
AtWnt1 : DRFD-GASRVLVLTNRG-----NVRRLALEFKPYHPEHKPPS-K-KD-LVYFENSED-FVFPDS : 248
CiWnt4 : QRFD-G--SVQ-----ARIRKGI-----LRPRNK-KHKNP-A-ID-LVYAKPSQTNFIE--P : 242
AtWnt5 : DKVD-GATEVKIN-----HRG-----KLQIRNPR-YNLPT-A-ED-LVYVDESED-YVVPNE : 246
NvWnt3 : VKVD-SAVEM-----TTK-VNRRGK-----KRLKPKYS-HFKKPS-D-KD-LVYFETSEN-YVDKN- : 241
AtWnt7-1 : KAKQSKKKV-----PHWGMVTRTPSHLKLKSKRVHRKPR-P-RD-LVYLENSEN-YIEKDL : 250
AtWnt7-2 : RRQ-IAKRV-----FAHFGGPAKKTTRKTRPLFLTKSKRPHRKPR-P-RD-LVYLENSEN-YEADP : 253
AtWnt2 : RKN-E-GAVQV-----T--MSNQMAL-----VSVDGTPYT-K-ID-LVYFESSED-FVAINK : 242
NvWnt16 : AEMK-DAIRA-----VYIKRKR-----KLKRKDNKKLRIPS-SS-LVYLDSEN-YVYRDK : 245
AtWnt16 : SKVD-NSIQV-----SLKAKRR-----LRRRGKVRKVPVQKEDLVHIHRSEN-YVIEDF : 243

      *      320      *      340      *      360      *
AtWnt1 : NL--GHRGTLGRI--NASSIGVDG--DILCCGRGHKAHREETSRLN-TFHTCCQVE-RT-KTRRLVHSL--- : 315
CiWnt4 : NLKRGSYGTGRGV--NESSIANDH--GIMCCGRGYHVETFMRPYGNV-VFETCCQVK-QE-RERVLTISY--- : 310
AtWnt5 : ET--GSWGTEGRV--NRTSPSTDG--NIMCCGRGYNTHKTTIKERL-KFHTCCQYVE-KTCHYVLDIQSK--- : 313
NvWnt3 : VT--VGSIGTSGRQ--NYTSNGIDG--ELLCCGRGHNIQQAKITRN--VFKVCCQVK-***** : 296
AtWnt7-1 : SR--GSLGIVGRE--NRTSKDIDG--DILCCGRGYNTHQYIRTWQ--N-KFHTCCQYVD-DRERTENYV--- : 317
AtWnt7-2 : MK--GSTGTSGRL--NRTSRGTDG--DILCCGRGYNTHQFRTAQ--R-KFHTCCQYVD-DRVTERTEVYSCK--- : 320
AtWnt2 : SL--GTLTGGRR--DRDSKGVG--AILCCGKGYDTRRELFAEK--S-KENYCCQVK-KVCREWKDVYTKHST : 312
NvWnt16 : KL--GIDGTSGRR--NKNSSGVVDG--DILCCGSGYNTQTVRSVHSH-***** : 288
AtWnt16 : KR--GILGTSGRR--NRTAKGPQS--NILCCGRGYNTQVHRRLER--C-KFHTCCQYVK-KTETMEEIYTK--- : 310

```

## Daten der Injektionsstatistiken

	Gesamt	Tot	% Tot	Überlebend	% Überlebend	Normal	% Normal	Gastrul. Def	% Gastrul. Def.		
NvWnt11 50pg dorsal	90	14	15,56%	76	84,44%	13	17,11%	63	82,89%		
NvWnt11 50pg ventral	72	11	15,28%	61	84,72%	53	86,89%	8	13,11%		
NvWnt11 100pg dorsal	103	28	27,18%	75	72,82%	58	77,33%	17	22,67%		
NvWnt11 100pg ventral	66	2	3,03%	64	96,97%	58	90,63%	6	9,38%		
NvWnt11 500pg dorsal	83	8	9,64%	75	90,36%	5	6,67%	70	93,33%		
NvWnt11 500pg ventral	10	0	0,00%	10	100,00%	9	90,00%	1	10,00%		
	Gesamt	% Gesamt	Tot	% Tot	Überlebend	% Überlebend	Normal	% Normal	Gastrul. Def	% Gastrul. Def.	
XIWnt11 Mo	192	100	131	68,23	71	36,98	34	47,89	37	52,22	
XIWnt11Mo/NvWnt11(100pg)	120	100	45	37,5	75	62,5	43	57,33	32	42,67	
XIWnt11Mo/NvWnt11(200pg)	234	100	84	35,9	150	64,1	117	78	33	22	
	Anzahl ges.	Tot	% Tot	Überlebend	% Überlebend	Normal	% Normal	DoppelteA.	% DoppelteA.	Gastrul. def.	% Gastrul. Def.
NvWntA 50pg ventral	20	16	80,00%	4	20,00%	3	75,00%	0	0,00%	1	25,00%
NvWntA 100pg ventral	100	21	21,00%	79	79,00%	54	68,35%	5	6,33%	20	25,32%
Xwnt8 50pg ventral	55	2	3,64%	53	96,36%	9	16,98%	44	83,02%	0	0,00%
Xwnt8 100pg ventral	56	5	8,93%	51	91,07%	9	17,65%	47	92,16%	0	0,00%
	Anzahl ges.	Tot	% Tot	Überlebend	% Überlebend	Normal	% Normal	DoppelteA.	% DoppelteA.	Gastrul. def.	% Gastrul. Def.
NvWntA 50pg dorsal	36	14	38,89%	22	61,11%	20	90,91%	0	0,00%	2	9,09%
NvWntA 100pg dorsal	61	4	6,56%	57	93,44%	7	12,28%	0	0,00%	50	87,72%
NvWntA 500pg dorsal	160	100	62,50%	60	37,50%	30	50,00%	0	0,00%	30	50,00%
NvWntA 1000pg dorsal	312	130	41,67%	182	58,33%	44	24,18%	0	0,00%	138	75,82%
	Anzahl ges.	Tot	% Tot	Überlebend	% Überlebend	Normal	% Normal	DoppelteA.	% DoppelteA.	Gastrul. def.	% Gastrul. Def.
NvWntA 50pg dorsal	36	14	38,89%	22	61,11%	20	90,91%	0	0,00%	2	9,09%
NvWntA 100pg dorsal	61	4	6,56%	57	93,44%	7	12,28%	0	0,00%	50	87,72%

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation  
selbstständig und ohne andere als die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'h' followed by a large, rounded flourish.

Groß-Umstadt, den 20.05.2005



## Lebenslauf

---

Geboren am 29.10.67 in Konstanz

- |           |  |
|-----------|--|
| 1974-1975 | Grundschule, Deutsche Schule Paris   |
| 1975-1980 | Grundschule und Förderstufe, Ernst-Reuter-Schule Groß-Umstadt  |
| 1980-1987 | Gymnasium, Max-Planck-Schule Groß-Umstadt; Abschluß mit Realschulreife 1987  |
| 1987-1989 | Wehrersatzdienst Johanniter-Unfallhilfe Nieder-Roden   |
| 1989-1993 | selbständige Arbeit als Transportunternehmer   |
| 1990-1993 | Berufliches Gymnasium, Landrat-Gruber-Schule Dieburg; Abschluß mit Abitur 1993   |
| 1993-2001 | Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt. Abschluß mit Diplom 2001, Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von T.W. Holstein „PCR-Suche und Charakterisierung der Wnt- und Tcf-Promotoren und der Struktur dieser Gene aus <i>Hydra vulgaris</i> “<br>Diplomprüfungen in Zoologie, Zell-und Entwicklungsbiologie und Genetik |

Dezember 2001 – Mai 2005 Doktorarbeit an der Technischen Universität bei Prof. Dr. T. W. Holstein. „Isolation, phylogenetische Analyse und Funktion von Wnt-Liganden bei *Nematostella vectensis*“

## Wissenschaftliche Publikationen

Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q. & Holstein, T. W. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156-60 (2005)

---

## Danksagung

Mehr Menschen als ich in diesem Rahmen danken kann, haben einen Beitrag zum Entstehen dieser Arbeit geleistet.

Danken möchte ich Prof. Thomas Holstein für die ausgezeichneten Bedingungen und die angenehme Atmosphäre, unter denen ich diese Arbeit anfertigen konnte. Er und Barbara Kostron haben meinen wissenschaftlichen Werdegang gerade dann unterstützt, wenn es schwierig war.

Bert Hobmayer, der mein Interesse an den Wnt-Signalwegen geweckt und gefördert hat.

Frau Prof. Felicitas Pfeifer und Monika Medina, die beitrugen einen Rahmen zu schaffen, in dem internationaler, wissenschaftlicher Austausch stattfand.

Der gesamten Arbeitsgruppe Holstein, in der gegenseitige Hilfe täglich praktiziert wird. Darunter besonders Andrea Busch und Gabi Hutter, die auch bei völlig unwissenschaftlichen Problemen jederzeit hilfreich zur Stelle waren. Stefanie Redemann und Heike Kaibel, für langwierige und erfolgreiche Laborarbeit. Anne Gorny, weil sie einfach nicht locker gelassen hat.

Jens Fritzenwanker, der meine Sympathie zu unserem „Haustier“ teilt wie niemand sonst.

Dem Graduiertenkolleg 340 in Darmstadt, für schöne Nachmittage und Abende.

Der DFG, für die Förderung meiner Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer den Rücken freihalten.

Und ganz besonders meiner geliebten Frau Anke, weil Sie da ist.